

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### **PRÉPARATION DE SÉRUMS ANTIDIPHTÉRIQUES DE TITRE FLOCCULANT ÉLEVÉ ET DE FAIBLE POUVOIR NEUTRALISANT PAR IMMUNISATION DE CHEVAUX SANS IMMUNITÉ DE BASE (SCHICK POSITIFS) AVEC UNE ANATOXINE DE HAUTE PURETÉ**

par M. RAYNAUD, E. H. RELYVELD, O. GIRARD et R. CORVAZIER (\*)  
(avec la collaboration technique de M<sup>lles</sup> O. BEPOLDIN  
et F. AUTIN).

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches)*

Depuis l'observation de Hitchens et Tingley [18], confirmée par Sordelli [48], puis par divers autres auteurs [3, 11, 9, 34], il est devenu habituel d'utiliser pour la production des sérums antidiphtériques, des chevaux présentant une immunité naturelle à la diphtérie.

La sélection de ces animaux peut être réalisée soit par la réaction de Schick, soit par titrage des anticorps antitoxiques présents dans leur sérum avant le début de l'immunisation.

Les chevaux Schick négatifs ou présentant au moins 0,1 UI d'antitoxine par millilitre, se révèlent en général meilleurs producteurs d'antitoxines. On peut les hyperimmuniser dans des délais plus brefs.

Glenny [12] a étudié l'origine de cette antitoxine antidiphtérique présente dans le sérum de certains chevaux, qui paraît être due à un contact ancien avec le bacille diphtérique et sa toxine.

(\*) Manuscrit reçu le 9 octobre 1958.

Quelle que soit l'origine de cette immunité naturelle, elle donne, aux chevaux qui la présentent, une aptitude particulière à la production rapide d'anticorps « avides ». Glenny et Südmersen [11], Barr et Glenny [3] ont étudié ce phénomène en détail.

Les chevaux dépourvus d'immunité antidiphthérique de base seraient donc en général de plus mauvais producteurs d'antitoxines que les chevaux présentant un certain degré d'immunité naturelle, sous les réserves exprimées par Glenny et Barr (1).

Ramon [34] a émis une opinion plus nuancée. Les chevaux présentant un certain degré d'immunité antidiphthérique au début de l'hyperimmunisation verraient simplement leur taux d'antitoxine s'élever plus rapidement que les chevaux Schick positifs. Avec un bon agent immunisant, ces derniers atteindraient le même taux final moyen que les chevaux Schick négatifs, si l'hyperimmunisation est prolongée pendant une période suffisamment longue.

Des observations analogues ont été faites pour la production d'antitoxine antitétanique ; il ne s'agit plus alors d'une immunité naturelle, mais d'une immunité acquise. Les chevaux vaccinés contre le tétanos longtemps avant leur utilisation sont de meilleurs producteurs d'antitoxine antitétanique que les animaux non vaccinés [14, 35, 36].

Nous avons, dans un travail antérieur, étudié l'hyperimmunisation de chevaux présentant une immunité de base naturelle, par des anatoxines diphthériques de haute pureté [43].

Ces chevaux ont montré des différences significatives dans la formation d'anticorps.

Certains chevaux réagissent au début de l'hyperimmunisation uniquement vis-à-vis de l'anatoxine et forment des anticorps dirigés contre cette protéine considérée comme une molécule de structure unique et bien homogène. Ces anticorps, testés par les techniques de double diffusion en gélose de Oakley et Fulthorpe [27] et de Ouchterlony [28, 29, 30] contre des toxines brutes concentrées, donnent une seule ligne de précipitation spécifique. Nous avons cependant démontré que ces anticorps sont en réalité hétérogènes [38, 46].

D'autres chevaux réagissent dès le début de l'hyperimmunisation vis-à-vis des impuretés présentes même en très faible quantité dans les préparations de toxine purifiée. Ces anticorps, que nous avons appelés « anticorps accessoires », sont présents dès

(1) Certains chevaux sans anticorps circulants décelables ont en effet une immunité antidiphthérique potentielle qui se révèle facilement. Après une seule injection d'anatoxine, ils fournissent en effet une réponse de type secondaire, alors que les animaux sans immunité potentielle fournissent une réponse de type primaire [4].

le début de l'hyperimmunisation ; les chevaux forment, dans ce dernier cas, peu d'anticorps antitoxine diphtérique.

Des observations du même genre ont été faites par d'autres auteurs.

Glenny [12, 13, 15] a étudié la « concurrence des antigènes » lorsqu'on immunise des chevaux contre plusieurs anatoxines (diphtérique, tétanique, toxines anaérobies). Les taux d'antitoxines contre chacune de ces toxines étaient toujours plus faibles chez les chevaux soumis à une hyperimmunisation mixte que chez les chevaux hyperimmunisés contre une seule toxine.

Barr et Llewellyn-Jones [5, 6, 7] signalèrent les mêmes faits et montrèrent que l'immunité de base joue également un rôle très important. Si l'animal présente une immunité de base contre l'un des antigènes présents dans une préparation vaccinnante hétérogène, il y aura surtout formation d'anticorps dirigés spécifiquement contre cet antigène, la production d'anticorps envers les autres antigènes diminuera.

Des résultats analogues ont été obtenus par d'autres auteurs [1, 2] qui ont tous montré que les facteurs à considérer dans le domaine de la « réponse immunitaire » sont : les proportions des antigènes employés, les quantités injectées et la présence d'immunité de base. Nous rappellerons aussi le fait que certaines protéines peuvent être de meilleurs antigènes que d'autres et que la présence d'un tel antigène dans une préparation hétérogène peut amener la formation d'anticorps spécifiques à taux élevé, même si sa concentration est faible [8, 21].

Nous avons montré, par la technique d'immuno-électrophorèse [43, 44, 45] que les anticorps antidiphtériques de cheval peuvent être associés aux  $\gamma$ -globulines et aux  $\beta_2$ -globulines, comme l'avaient déjà signalés d'autres auteurs [19, 20].

Ceux des chevaux qui ont donné des taux élevés d'antitoxine finale ont en général présenté durant l'hyperimmunisation une première phase où l'antitoxine était de type  $\gamma$ -globuline prédominante, suivie d'une deuxième phase où l'antitoxine était uniquement de type  $\beta_2$ .

Dans la première phase, le rapport  $L+ / Lf$  était élevé, voisin de 2 ; dans la deuxième phase, il était voisin de 1. Parallèlement, la forme de la courbe de précipitation quantitative changeait : les  $\gamma$ -globulines donnaient une courbe de type précipitine (ou type lapin), les  $\beta_2$ -antitoxines donnaient une courbe de type floculation (ou type cheval) [44, 45].

Nous rapportons dans cette étude les résultats obtenus en immunisant avec une anatoxine de haute pureté adsorbée sur phosphate de calcium, des chevaux ne présentant pas au départ une immunité antidiphtérique naturelle.



Les recherches antérieures sur l'hyperimmunisation de ces animaux ont été faites avec des préparations non purifiées. La formation d'anticorps accessoires devait donc être fréquente, quoique non toujours reconnue.

L'emploi d'une anatoxine pure nous a semblé être le moyen d'obtenir des titres élevés d'anticorps antitoxiques.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La toxine diphtérique pure titrant 3 000 UF/mg N a été préparée selon une technique antérieurement décrite [37, 47] ; elle ne présente qu'un seul constituant antigénique décelable par les techniques de précipitation spécifique en gel.

La toxine a été détoxifiée par le formol ; elle est d'abord dialysée contre une solution de bicarbonate à 0,1 p. 100 ; on ajoute ensuite

TABLEAU I. — Hyperimmunisation de chevaux à Schick positif.  
Première phase : avec de l'anatoxine pure.

Jours après la 1 <sup>re</sup> injection	UF injectés	Titre floculant				Chevaux injectés
		Cheval n° 824	Cheval n° 825	Cheval N° 854	Cheval n° 859	
1 <sup>re</sup> injection	25	0	0	0	0	tous les 4
3 <sup>o</sup> j après	50	0	0	0	0	" " "
7 <sup>o</sup> j après	100	0	0	0	0	" " "
10 <sup>o</sup> j après	250	-	-	-	-	" " "
14 <sup>o</sup> j après	500	0	30	100	75	" " "
17 <sup>o</sup> j après	750	0	45	100	130	" " "
21 <sup>o</sup> j après	1000	0	150	230	190	" " "
24 <sup>o</sup> j après	-	30	400	260	240	-
25 <sup>o</sup> j après	1500	-	-	300	250	tous les 4
28 <sup>o</sup> j après	2000	-	-	-	-	n°824 & 825
29 <sup>o</sup> j après	-	-	-	250	230	-
31 <sup>o</sup> j après	3000	-	-	-	-	n°824 & 825
35 <sup>o</sup> j après	-	215	-	-	-	-
39 <sup>o</sup> j après	-	180	670	-	-	-
43 <sup>o</sup> j après	-	130	-	-	-	-

« Ce signe signifie *idem* ; — Ce signe signifie néant.

une certaine quantité de formol neutre (préparation commerciale à 35 p. 100) de façon à obtenir une concentration finale de 2 p. 1 000 (volume/volume).

La toxine reste à 37° jusqu'à détoxification complète. L'anatoxine ainsi obtenue est adsorbée sur phosphate de calcium [40, 46, 47].

Le titrage *in vitro* de l'antitoxine est fait par la méthode de floculation, selon la technique Ramon [33] avec un sérum étalonné avec le sérum étalon international de floculation de Copenhague.



TABLEAU I bis. — Hyperimmunisation de chevaux à Schick positif.  
Deuxième phase : avec de l'anatoxine brute.

Jours après la 1 <sup>re</sup> injection	UF injectées	Titre flocculant				Chevaux injectés
		Cheval n° 824	Cheval n° 825	Cheval n° 854	Cheval n° 859	
45 <sup>e</sup> jour	4800	-	430	30	110	n°825, 854 859
49 <sup>e</sup> jour	9600	-	380	120	90	n°825, 854 859
52 <sup>e</sup> jour	16000*	< 60	400	320	150	tous les 4
56 <sup>e</sup> jour	9600	40	-	-	-	n° 824
58 <sup>e</sup> jour	-	-	430	580	320	-
59 <sup>e</sup> jour	16000	170	-	-	-	n° 824
60 <sup>e</sup> jour	-	-	400	600	300	-
64 <sup>e</sup> jour	-	-	320	560	230	-
67 <sup>e</sup> jour	-	320	-	-	-	-
71 <sup>e</sup> jour	-	230	-	-	-	-
77 <sup>e</sup> jour	4000	-	-	-	-	tous les 4
80 <sup>e</sup> jour	6000	-	-	-	-	" " "
85 <sup>e</sup> jour	8000	-	-	-	-	" " "
88 <sup>e</sup> jour	12000	-	-	-	-	" " "
95 <sup>e</sup> jour	-	550	300	350	250	-
99 <sup>e</sup> jour	-	380	240	330	180	-

\* Sauf pour le cheval n° 824 : 4 800 UF. « Ce signe signifie *idem* ; — Ce signe signifie néant.

Le titrage du pouvoir neutralisant *in vivo* a été fait sur cobaye, au niveau L+/I, selon la technique classique [31].

Les chevaux choisis (n° 824, 825, 854 et 859) présentaient au départ moins de 0,1 unité antitoxique par millilitre de sérum.

L'hyperimmunisation avec l'anatoxine pure a été faite jusqu'au vingt-cinquième jour pour les chevaux 854 et 859 et jusqu'au trente et unième jour pour les chevaux 824 et 825.

Après une courte période de repos jusqu'au quarante cinquième jour, les chevaux ont été immunisés avec de l'anatoxine brute. Nous avons voulu contrôler si les animaux continueraient à former de l'antitoxine ou s'ils allaient former de façon prédominante des « anticorps accessoires ».

#### RÉSULTATS.

Les tableaux I et I bis montrent le protocole d'immunisation ainsi que les résultats de certaines saignées. Le tableau II reproduit les caractères des antitoxines des saignées principales.

La figure 1 montre la montée des anticorps pendant la première période de l'hyperimmunisation et la figure 2 les rapports *in vivo/in vitro* des saignées principales.

Pendant toute la première période de l'hyperimmunisation, effectuée avec l'anatoxine pure, les sérums contiennent, à côté de l'antitoxine, un ou deux anticorps accessoires (pl. I, tableau II). Ces anticorps présents en faible concentration montrent que la toxine contenait à l'état de trace, deux autres constituants antigéniques. Les tests de diffusion en gélose ont été faits avec une toxine brute, suivant une technique antérieurement décrite [41, 46]. L'immunisation de ces chevaux avec une anatoxine brute a entraîné la formation de nombreux anticorps accessoires (pl. I, tableau II).

TABLEAU II. — Caractères de diverses saignées effectuées chez des chevaux à Schick positif, au cours de l'hyperimmunisation.

Cheval	Saignée	Titre flocul.	L+/ml	Rapport L+/Lf	Mg N/ml	Nombre anneaux	Nature des anticorps	
							$\beta_2$	$\gamma$
824	39° j	180	20	0,11	13	1 (+1)	+++	+
824	43° j	130	50	0,38				
824	67° j	320	170	0,53	15,3	5	+++	+
824	71° j	230	130	0,57	13,8	5	+++	+
824	95° j	550	450	0,82	16,3	8	++++	±
824	99° j	380	300	0,79	14,2	8	++++	±
825	39° j	670	215	0,32	14,1	1 (+1)	++(+)	++
825	60° j	400	270	0,68	14,1	4	+++	+
825	64° j	320	170	0,53	13,5	4	+++	+
825	95° j	300	225	0,75	17,5	7	++++	±
825	99° j	240	175	0,73	14,7	7	++++	±
854	25° j	300	115	0,38	12,1	1 (+2)	++	++
854	29° j	250	90	0,36	11,5	1 (+2)	++	++
854	60° j	600	525	0,88	12,5	4	+++	+(+)
854	64° j	560	425	0,76	13,4	4	+++	+(+)
854	95° j	350	350	1	16,2	8	+++	+
854	99° j	330	275	0,84	14,8	8	+++	+
859	25° j	250	90	0,36	13,7	1 (+2)	++(+)	++
859	29° j	230	50	0,22	10,8	3	++(+)	++
859	60° j	300	175	0,59	14,8	4	+++	+
859	64° j	230	175	0,76	13,4	4	+++	+
859	95° j	250	175	0,70	14	7	++++	(±)
859	99° j	180	125	0,70	14,4	7	++++	(±)

La nature électrophorétique de l'antitoxine a été déterminée par l'immuno-électrophorèse, selon Grabar et Williams [46, 47, 49, 50], suivant des modalités antérieurement décrites [42, 44].

La détection par la toxine (à un seul constituant antigénique) permet de différencier l'antitoxine des anticorps accessoires.

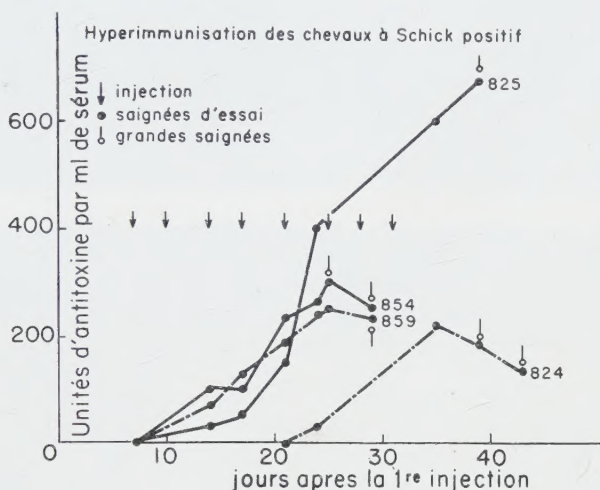


FIG. 1.

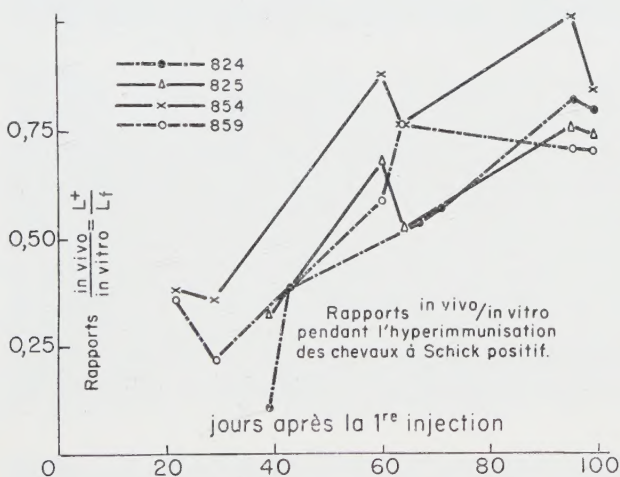


FIG. 2.

Tous les chevaux ont formé au début de l'hyperimmunisation des anticorps de type  $\gamma$ -globuline en quantité élevée ; dans une deuxième phase de l'hyperimmunisation, il y a surtout formation de  $\beta_2$ -antitoxines (pl. II, tableau II). Ces résultats sont donc



conformes à ceux obtenus chez des chevaux présentant une immunité de base [43].

Le pouvoir neutralisant des anticorps n'évolue pas de façon parallèle au pouvoir floculant des anticorps. Le pouvoir neutralisant augmente beaucoup plus lentement que le pouvoir précipitant, si bien que les rapports *in vivo/in vitro* (L+/Lf) des sérums sont très bas.

Après une hyperimmunisation très prolongée, il y a formation d'anticorps neutralisants et les rapports se rapprochent de plus en plus de l'unité.

Il n'y a donc pas de correspondance obligatoire entre les valeurs élevées, voisines de 2, du rapport L+/Lf et la localisation des antitoxines dans les  $\gamma$ -globulines, comme les résultats de Kekwick et Record [19, 20], Cinader et Weitz [10] et les nôtres [44, 45] le laissaient supposer.

#### DISCUSSION.

La formation d'anticorps antitoxine diphtérique a été étudiée antérieurement chez des chevaux sans immunité de base. Cette étude a déjà fait l'objet de plusieurs recherches, l'agent immunisant étant en général représenté par une anatoxine brute. Les résultats ont toujours été très nets : les chevaux sans immunité de base se montraient de médiocres producteurs d'antitoxine. Ces faits ont conduit à éliminer dans la pratique ces animaux pour la production commerciale des sérums antitoxiques.

Les données sur la concurrence antigénique nous ont fait supposer que les échecs pouvaient en partie lui être imputés. Les préparations employées jusqu'à nos expériences et celles de Pope [32] pour l'hyperimmunisation étaient très impures et il n'existe *a priori* aucune raison pour qu'il y ait formation d'anticorps antitoxiques en quantité élevée par rapport aux anticorps accessoires.

Les filtrats de culture du bacille diphtérique contiennent, outre la toxine spécifique, de nombreux antigènes. Il a été démontré que les sérums des animaux hyperimmunisés avec ces préparations contiennent également outre l'antitoxine, de nom-

#### LEGENDE DE LA PLANCHE I

De haut en bas : Sérum 825, saignée du 39<sup>e</sup> jour ; sérum 825, saignée du 60<sup>e</sup> jour ; sérum 854, saignée du 29<sup>e</sup> jour ; sérum 854, saignée du 95<sup>e</sup> jour. Les sérums gélés dans la couche inférieure ont été dilués à une concentration de 100 UF/ml ; couche intermédiaire, gélose sans sérum. La toxine brute non gélifiée a été ajoutée à une concentration de 450, 250, 100, 50 et 25 UF/ml au-dessus de la couche intermédiaire (de gauche à droite). La reproduction photographique présente seulement les couches inférieures.

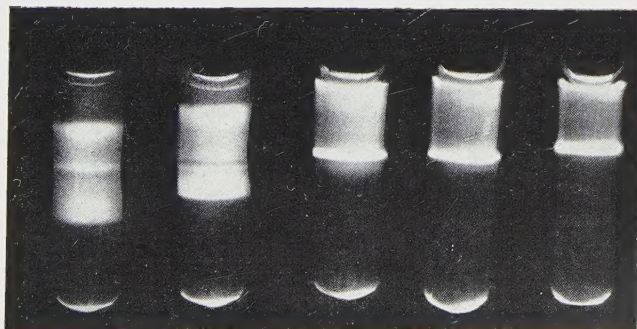
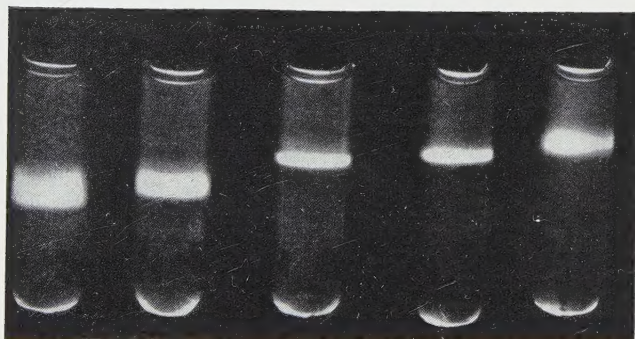
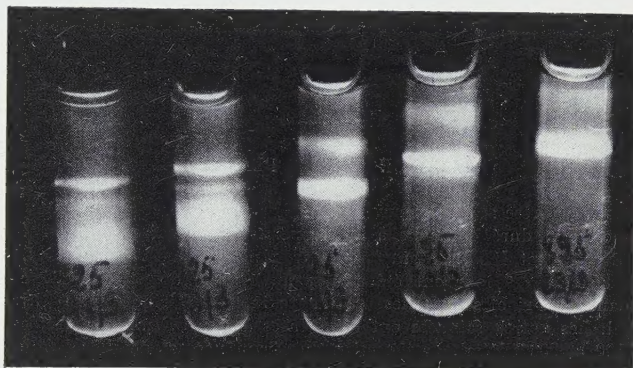
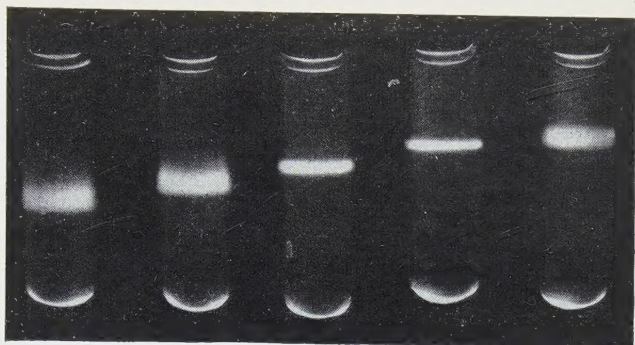
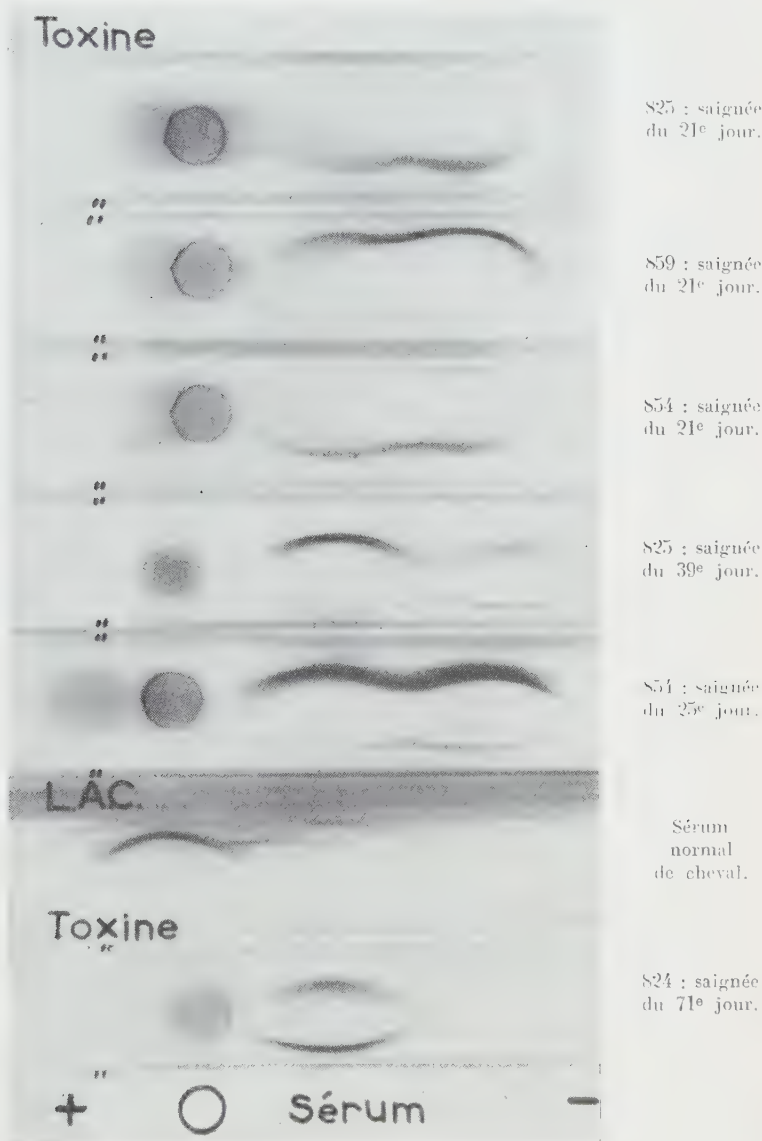


PLANCHE I.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE II

Immunoélectrophorèse : Le sérum (0,1 ml) a été placé au point marqué 0. L'électrophorèse a duré 4 heures à la température ordinaire ; tension 4 volts/cm, intensité du courant 180 milli-ampères pour 4 plaques de 13×18 cm. Les saignées 825, 859, 854 du 21<sup>e</sup> jour ont été diluées au 1/2, la détection a été effectuée en plaçant dans les rigoles latérales de la toxine diphtérique pure titrant 50 et 100 UF/mi. Les autres saignées ont été diluées à 100 UF/ml et détectées avec une toxine à 100 et 200 UF/ml. La détection du sérum normal de cheval (dilution 1/20) a été faite avec du sérum de lapin anti-cheval (L.A.C.). Le signe 0 indique le point d'origine (l'anode étant à gauche, la cathode à droite).





Toxine ou L. A. C. (Sérum de lapin, anti-sérum de cheval)  
dans les rigoles.

PLANCHE II.



breux anticorps accessoires. Nous avons montré que la formation de ces anticorps est supprimée si les animaux sont hyperimmunisés avec des anatoxines pures [43]. Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs [32].

Cette étude montre que les résultats obtenus avec des chevaux sans immunité de base ne tiennent pas à une certaine incapacité des animaux à produire des anticorps antitoxiques, mais sont plutôt en rapport avec les préparations d'antigènes employées.

Les quatre chevaux que nous avons immunisés ont formé des anticorps antitoxiques flocculants. Nous n'avons pas eu, comme cela a été le cas pour le même type d'expériences chez des animaux avec immunité de base, des chevaux réagissant surtout vis-à-vis des impuretés présentes dans les préparations vaccinales, même en faible quantité et ne formant pas d'anticorps antitoxiques [43].

Les anticorps antitoxiques formés chez le cheval sans immunité de base au début de l'hyperimmunisation sont néanmoins différents des anticorps généralement rencontrés. Ces anticorps précipitants ont seulement un très faible pouvoir neutralisant.

Les caractères de ces anticorps peuvent être expliqués de deux façons :

1° Les anticorps de début d'immunisation sont mal adaptés au motif antigénique de la toxine et donnent avec celle-ci des combinaisons labiles, aisément dissociables *in vivo*.

2° La molécule de toxine possède plusieurs groupements antigéniques différents. Un seul d'entre eux donne naissance à des anticorps neutralisants. Les autres motifs antigéniques donnent naissance à des anticorps non neutralisants.

Cette hypothèse est analogue à celle qui a été défendue par Lapresle [22, 23, 24, 25, 26] en ce qui concerne le système sérum-albumine humaine et anticorps correspondants. Nous développerons ailleurs les arguments expérimentaux qui sont en faveur de la validité de cette deuxième hypothèse [38, 39, 46].

#### RÉSUMÉ.

La formation d'anticorps antidiphtériques chez des chevaux sans immunité de base a été étudiée.

Avec une anatoxine pure, il y a formation d'anticorps précipitants chez tous les animaux étudiés.

L'emploi d'une anatoxine brute au cours de l'hyperimmunisation provoque la formation d'anticorps accessoires. Les anticorps sont associés aux  $\beta_2$  et aux  $\gamma$ -globulines du sérum.

Les deux types d'anticorps ( $\gamma$  et  $\beta_2$ ) sont, au début de l'hyperimmunisation, faiblement neutralisants. Les rapports *in vivo*, *in vitro* sont très bas.



## SUMMARY

PREPARATION OF ANTI-DIPHTHERIA SERA OF HIGH FLOCCULATING TITER  
AND LOW NEUTRALIZING CAPACITY,  
BY MEANS OF IMMUNIZATION OF SCHICK-POSITIVE HORSES  
WITH A HIGHLY PURIFIED TOXOID.

The formation of diphtheria antitoxin has been studied in Schick positive horses.

A pure toxoid induces the formation of precipitating antibodies in all the animals.

Replacement of the pure toxoid by a non purified one results in formation of antibodies against other diphtheria proteins (« accessory antibodies »). The antibodies are localized in the  $\beta_2$  and  $\gamma$ -globulin serum fractions.

Both types of antibodies have at the beginning of the hyper-immunization low neutralizing titers. The L+/Lf values are low.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABRAMOFF (P.) et WOLFE (H. R.). *J. Immunol.*, 1956, **77**, 94.
- [2] ADLER (F. L.). *J. Immunol.*, 1957, **78**, 201.
- [3] BARR (M.) et GLENNY (A. T.). *J. Hyg.*, 1945, **44**, 135.
- [4] BARR (M.). *J. Path. Bact.*, 1951, **63**, 557.
- [5] BARR (M.) et LLEWELLYN-JONES (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 12.
- [6] BARR (M.) et LLEWELLYN-JONES (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 233.
- [7] BARR (M.) et LLEWELLYN-JONES (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1955, **36**, 147.
- [8] BJØRNEBOE (M.). *Z. Immunitätsforsch.*, 1941, **99**, 245.
- [9] CELAREK (J.) et POREBSKI (W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1017.
- [10] CINADER (B.) et WEITZ (B.). *Nature*, 1950, **166**, 785.
- [11] GLENNY (A. T.) et SÜDMERSEN (H. J.). *J. Hyg.*, 1921, **20**, 176.
- [12] GLENNY (A. T.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 241.
- [13] GLENNY (A. T.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 251.
- [14] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.), WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 481.
- [15] GLENNY (A. T.) et WADDINGTON (H.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 118.
- [16] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [17] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 67.
- [18] HITCHENS (A. P.) et TINGLEY (E. K.). *J. Immunol.*, 1917, **2**, 395.
- [19] KEKWICK (R. A.) et RECORD (B. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 29.
- [20] KEKWICK (R. A.). *Chemistry and Industry*, 1941, **60**, 486.
- [21] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*, 2<sup>e</sup> édit., Harvard University Press Cambridge, 1945.

- [22] LAPRESLE (Cl.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, **37**, 969.
  - [23] LAPRESLE (Cl.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
  - [24] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **39**, 833.
  - [25] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 62.
  - [26] LAPRESLE (Cl.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 38.
  - [27] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
  - [28] OUCHTERLONY (O.). *Ark. Kemi Min. Geol.*, 1949, **26 B**, 1.
  - [29] OUCHTERLONY (O.), ERICSSON (H.) et NEUMULLER (C.). *Acta med. scand.*, 1950, **138**, 176.
  - [30] OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, **22**, 231.
  - [31] *Pharmacopée Française*, 7<sup>e</sup> édit., 1949, p. 738.
  - [32] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1958, **39**, 139.
  - [33] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661.
  - [34] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 485.
  - [35] RAMON (G.) et DESCOMBEY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1202.
  - [36] RAMON (G.), DESCOMBEY (P.), LEMÉTAYER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **46**, 444.
  - [37] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 424.
  - [38] RAYNAUD (M.). *Henry Ford Hospital Int. Symposium*, 1958, Academic Press Inc., New York (à paraître).
  - [39] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
  - [40] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.
  - [41] RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.), LAFFAILLE (A.), PARIS (C.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 301.
  - [42] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
  - [43] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
  - [44] RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 246.
  - [45] RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1958, p. 147.
  - [46] RELYVELD (E. H.). *Etudes sur la toxine et l'antitoxine diphtériques et la réaction toxine-antitoxine*. Thèse Sciences, Paris, juin 1958.
  - [47] RELYVELD (E. H.), RAYNAUD (M.) et BEN EPHRAÏM (S.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
  - [48] SORDELLI. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 314.
  - [49] WILLIAMS (C. A. Jr). *Thèse*, Rutgers University, New Brunswick, 1954.
  - [50] WILLIAMS (C. A. Jr) et GRABAR (P.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 158, 397 et 404.
-

# **L'ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR DES SOUCHES DE *BACILLUS LARVAE* WHITE D'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE DIFFÉRENTE**

par C. TOUMANOFF et M<sup>me</sup> L. MALMANCHE (\*).

(Institut Pasteur)

Dans des publications antérieures ont été présentés les résultats concernant l'effet des antibiotiques sur diverses bactéries aérobies sporogènes [3, 4].

Parmi les bacilles pathogènes pour les insectes, *Bacillus larvae* White, agent pathogène de la loque américaine des larves d'abeilles, présente des particularités quant à sa culture.

En effet, ce germe ne pousse pas sur gélose ordinaire et on ne peut le cultiver que sur ce milieu additionné de jaune d'œuf ainsi que sur certains milieux synthétiques en présence de facteurs de croissance.

On trouvera des renseignements sur ce germe et son comportement dans diverses conditions, dans un exposé d'ensemble que nous avons publié antérieurement [5].

D'après les observations effectuées sur la loque américaine en France et ailleurs, il semble bien que cette affection, quoique étant une maladie très grave du couvain, puisse parfois, localement, être bénigne et même, dans certaines conditions, disparaître des ruchers atteints.

Il n'est pas exclu ainsi qu'il existe dans diverses régions géographiques des souches différentes de ce germe.

La culture de *B. larvae* s'avérant, comme nous l'avons dit, peu commode, il est difficile de distinguer les souches d'origine différente en ayant recours à leurs seules propriétés biochimiques.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de savoir si la sensibilité de souches de *Bacillus larvae* White d'origines géographiques différentes était variable à l'égard de divers antibiotiques.

L'effet des antibiotiques sur *Bacillus larvae*, agent pathogène de la loque américaine des abeilles, a été étudié par certains auteurs (Haseman, 1948 [1]; Katznelson, 1950 [2]).

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.



Haseman rapporte avoir obtenu un certain succès dans le traitement de cette forme de loque par la pénicilline et la streptomycine, mais attire l'attention sur la difficulté d'application des antibiotiques dans les ruches.

Katznelson, au Canada, a établi que, parmi 13 antibiotiques dont il étudia l'action sur *B. larvae*, c'est l'auréomycine qui fut le plus actif contre ce bacille, suivi par la chloromycétine, la streptomycine, la clavicine, la gliotoxine, la subtiline et la tyrothricine, mais que néanmoins la pénicilline et aussi la clavicine, la bacitracine, la subtiline et même l'auréomycine n'ont pas empêché le développement de la loque américaine chez les larves d'un rucher.

Cet auteur conclut qu'on ne saurait utiliser les antibiotiques dans le traitement de la loque américaine, la plupart des antibiotiques n'exerçant pas d'effet sur les spores et le milieu de la ruche se prêtant très mal à leur action *in vivo*.

Nous avons essayé, en utilisant la technique habituelle des disques, de reconnaître l'effet sur *Bacillus larvae* de douze antibiotiques.

Nos essais ont porté sur les souches que nous avons isolées des spécimens de couvain qui nous ont été adressés du Japon (Saitana), d'Angleterre, d'Afrique du Nord : Oran, Aboukir et Habra (Algérie), de France (de Digne et du Doubs).

Les bacilles ont été ensemencés dans des boîtes de Petri sur milieu gélose-sérum additionné de jaune d'œuf. Nous n'avons pas pu utiliser le milieu standard de l'Institut Pasteur pour les antibiotiques, car même après addition de jaune d'œuf, la croissance du germe n'a pas été obtenue sur ce milieu.

L'effet des antibiotiques a été établi par une simple mesure des zones d'inhibition, dont l'apparition avec certaines souches dénote que la diffusion des antibiotiques se produit bien dans ce milieu.

Le tableau I montre les résultats obtenus.

Comme on le voit par ce tableau, la souche du Japon (Saitana) s'est montrée la plus sensible à l'égard des antibiotiques, ayant présenté au bout de quatre jours de culture des zones d'inhibition avec 8 antibiotiques sur 12, et plus particulièrement avec l'érythromycine.

La croissance de la souche isolée du couvain d'Angleterre n'a présenté, au bout de quarante-huit heures, qu'une inhibition tardive avec la tétracycline.

En ce qui concerne les trois souches d'Algérie, elles se sont comportées différemment. C'est ainsi que la souche isolée du couvain reçu de M. Paradeau, de Habra, s'est montrée résistante à tous les antibiotiques utilisés; celle d'Aboukir ne présente une zone d'inhibition nette qu'avec le chloramphénicol et

TABLEAU I. — Souches de *Bacillus larvae* cultivées en présence d'antibiotiques (milieu gélose sérum à l'œuf en boîte de Petri)

Souches	: :résultats :en jours : :	:Tetra- :cycline: :diam/mm : :	:Auréo- :mycine: :diam/mm : :	:Terra- :mycine: :diam/mm : :	:Erythro- :mycine: :diam/mm : :	:Spira- :(Rova- :mycine) :diam/mm : :	:Carbo- :(Magna- :mycine) :diam/mm : :
<i>Bacillus larvae</i> du Japon (Saitana)	: 48 h : : 4 j :	: 19 mm : : 19,5 mm :	: 19 mm : : 20 mm :	: 22 mm : : 22 mm :	: 0 : : 30 mm :	: 0 : : 0 :	: 0 : : 0 :
<i>Bacillus larvae</i> d'Angleterre	: 48 h : : 4 j : : 8 à 10 j :	: 0 : : 0 : : 15 mm :	: 0 : : 0 : :	: 0 : : 0 : :	: 0 : : 0 : :	: 0 : : 0 : :	: 20 mm : : :
<i>Bacillus larvae</i> de Digne	: 24 h : : 48 h : : 4 j :	: 11 mm : : 11 mm : : 12 mm++ :	: 12,5 mm ++ : : 12,5 mm ++ : :	: 0 : : 0 : : 0 :	: 0 : : 0 : : 0 :	: 0 : : 0 : : 0 :	: 0 : : 0 : : 0 :
<i>Bacillus larvae</i> (Paradeau Algérie)	: 4 j :	:	:	:	: 0 :	: 0 :	: 0 :
<i>Bacillus larvae</i> Oran	: 48 h : : 4 j :	: 21 mm : : 21 mm :	: 21 mm : : 21 mm ++ :	: 0 : : 0 :	: 0 : : 0 :	: 0 : : 0 :	: 0 : : 0 :
<i>Bacillus larvae</i> Aboukir	: 48 h : : 8 j :	: 0 : :	: 0 : :	: 0 : :	: 0 : :	: 0 : :	: 0 : :
<i>Bacillus larvae</i> du Doubs	: 48 h : : 4 j :	: 0 : : 24 mm ++ :	: 21 mm : : 21 mm ++ :	: 0 : : 25 mm :	: 0 : : 0 :	: 0 : : 0 :	: 26 mm : : 26 mm :

++ Zone d'inhibition très nette ; 0 Pas de zone d'inhibition.

assez forte après huit jours de croissance avec la bacitracine.

La souche d'Oran, par contre, fut sensible à l'égard de la tétracycline, de la framycétine et de la pénicilline, se montrant résistante à l'égard des autres antibiotiques utilisés.

Les souches françaises, celle de Digne et du Doubs, se montrent plus ou moins semblables, celle du Doubs cependant est sensible à un plus grand nombre d'antibiotiques. En effet, elle a été inhibée par la tétracycline, l'auréomycine, la bacitracine, la streptomycine et la pénicilline, soit 9 antibiotiques sur 12 utilisés. Par contre, celle de Digne s'est avérée résistante à l'égard de la carbomycine et de la streptomycine et n'a montré, comme on peut le voir dans notre tableau, que tardivement des zones d'inhibition avec certains antibiotiques actifs à l'égard de la souche du Doubs.

Nos essais répétés à plusieurs reprises ont ainsi montré que

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — « *Bacillus larvae* » du Japon (Saitana). Culture de dix jours sur milieu gélose-sérum à l'œuf.

FIG. 2. — « *Bacillus larvae* » d'Angleterre. Culture de dix jours sur milieu gélose-sérum à l'œuf.

Antibiotiques employés : T : Tétracycline ; A : Auréomycine ; O : Terramycine ; E : Erythromycine ; S : Spiramycine (Rovamycine).

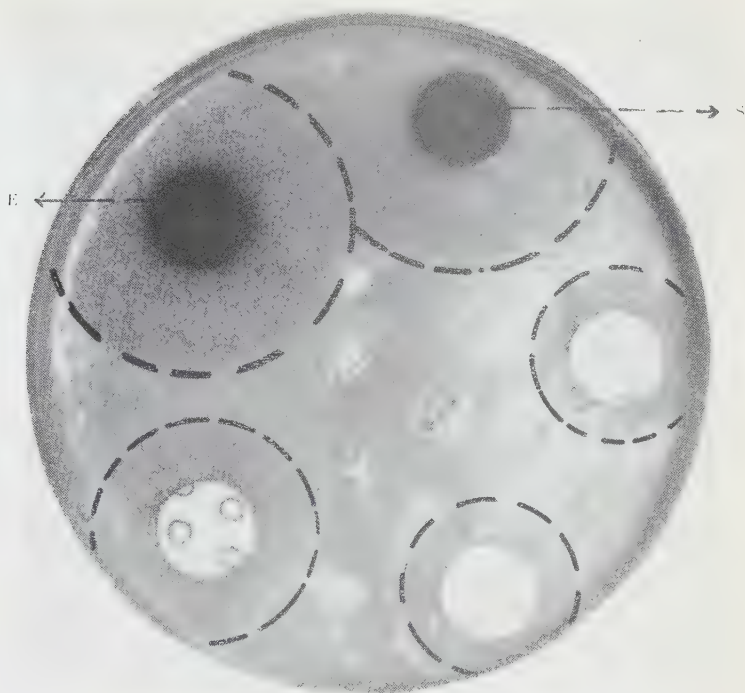


FIG. 1.

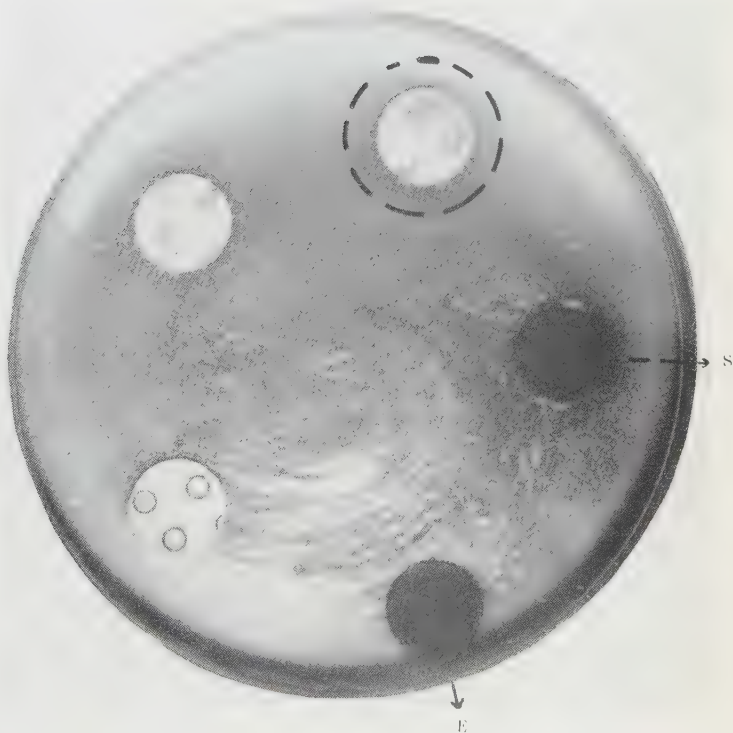


FIG. 2.





TABLEAU II. — Souches de *Bacillus larvae* cultivées en présence d'antibiotiques (milieu gélose sérum à l'œuf en boîte de Petri)

Souches	résultats: en jours	Framy- cétine	Neomy- cine	Baci- tracine	Chloram- phenicol	Strepto- mycine	Pénicil- line
		diam/mm	diam/mm	diam/mm	diam/mm	diam/mm	diam/mm
<i>Bacillus larvae</i> du Japon (Saitana)	48 h 4 j	0 0	0 0	19 mm 11 mm	0 20 mm	0 12 mm	0 25 mm
<i>Bacillus larvae</i> d'Angleterre	48 h 4 j 8 à 10 j	0 0 :	0 0 :	18 mm :	18 mm :	0 0 :	22 mm 0 :
<i>Bacillus larvae</i> de Digne	24 h 48 h 4 j	0 0 :	0 0 :	0 10 mm 14 mm++	0 0 23 mm++	0 0 27 mm	0 0 31 mm++
<i>Bacillus larvae</i> (Paradeau Algérie)	4 j	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus larvae</i> Oran	48 h 4 j	10 mm 11 mm	0 0	0 0	0 0	0 0	30 mm 30 mm++
<i>Bacillus larvae</i> Aboukir	48 h 8 j	0 0 0	0 0 0	0 35 mm	19 mm	0	0
<i>Bacillus larvae</i> du Doubs	48 h 4 j	11 mm 11 mm++	13 mm 13 mm++	0 26 mm	0 0	0 31 mm	31 mm 31 mm++

++ Zone d'inhibition très nette ; 0 Pas de zone d'inhibition.

les souches de *Bacillus larvae* provenant de diverses régions géographiques réagissent différemment à l'égard des divers antibiotiques et qu'on peut différencier diverses souches par l'emploi des disques imprégnés d'antibiotiques.

On doit dire que, dans l'ensemble, on ne saurait, d'après d'autres auteurs, espérer de bons résultats pratiques dans le traitement de cette forme de loque par les antibiotiques. Toutefois des essais nouveaux dans ce sens, s'ils étaient entrepris, devraient être précédés, comme il est d'usage dans le cas d'autres germes pathogènes, par l'étude de l'action des antibiotiques *in vitro*.

## SUMMARY

ACTION OF ANTIBIOTICS ON *B. larvae* WHITE STRAINS OF VARIOUS GEOGRAPHICAL ORIGIN.

Strains of *Bacillus larvae* White (cause of American foulbrood of bee larvae) from different sources (France, England, Japan, North Africa) were recognized to have a different sensitivity towards different antibiotics.

There are certainly many strains of this bacillus in nature more or less virulent for bee larvae. It is suggested that antibiotics may be used for the differentiation of different strains of *B. larvae* and also recommended that the use of antibiotics for treatment of American foulbrood should be preceded by a test of their effect *in vitro*.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] HASEMAN (L.). in KATZNELSON. *J. econ. Entomology*, 1948, **41**, 120.
- [2] KATZNELSON (H.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 4.
- [3] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 370.
- [4] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 563.
- [5] TOUMONOFF (C.). *Maladies des Abeilles* (Monographie), 325 p.,  
113 fig., numéro spécial *Rev. Franç. Apiculture*, août 1951.

# **ACTION DE L'INH ET DE LA D-CYCLOSÉRINE SUR LA PEROXYDASE PURIFIÉE ET SUR L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE DES BACILLES TUBERCULEUX**

par A. ANDREJEW, Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET (\*) (\*\*).

*(Institut Pasteur de Lille)*

Nous avons vu précédemment que les souches de bacilles tuberculeux résistantes à l'INH, qui sont dépourvues de peroxydase et de catalase, possèdent, cependant, les cytochromes des types *a*, *b* et *c*, ainsi qu'une activité cytochrome-oxydasique [4], tandis que les bacilles tuberculeux sensibles à l'INH possèdent, à la fois, les activités catalasique et peroxydasique, et le système cytochrome-oxydasique.

Nous avons signalé, d'autre part [2], que certains enzymes-flavines (producteurs d'eau oxygénée) ne sont inhibés par l'INH, ni directement ni indirectement, puisqu'ils fonctionnent, à l'état isolé, aussi bien en présence qu'en l'absence d'INH, et puisqu'ils sont formés aussi bien par les bactéries sensibles que par les bactéries résistantes à l'INH et cultivées en présence d'INH.

Cette production d'eau oxygénée donnait un intérêt accru à la question de l'absence de la catalase et de la peroxydase chez les souches résistantes à l'INH que nous avons étudiées.

Dans un travail précédent [3] nous avons signalé certaines caractéristiques physico-chimiques de l'action de l'INH et de la D-cyclosérine sur la catalase purifiée et l'activité catalasique des bacilles tuberculeux sensibles et résistants à l'INH ou à la D-cyclosérine. Nous avons montré, en particulier, que l'activité catalasique de certaines souches de bacilles tuberculeux résistantes à la D-cyclosérine (inhibiteur de la catalase) est fortement augmentée par rapport aux souches témoins. En revanche, l'activité catalasique des souches résistantes à l'INH (un autre inhibiteur de la catalase) est fortement abaissée ou nulle [4, 5].

(\*) Manuscrit reçu le 6 octobre 1958.

(\*\*) Travail exécuté avec l'aide du C. N. R. S.

Dans le présent travail, nous exposons les résultats obtenus en ce qui concerne l'action de l'INH et de la D-cyclosérine sur la peroxydase purifiée du raifort et sur l'activité peroxydasique des bacilles tuberculeux (sensibles et résistants à ces substances) et de leurs extraits.

MÉTHODES. — L'activité de la peroxydase purifiée du raifort est mesurée au spectrophotomètre de Jobin et Yvon, à 470 m $\mu$ , suivant la méthode développée par Devlin [6] et basée sur les réactions suivantes, catalysées par la peroxydase :



où E = enzyme (peroxydase), S = substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ES = complexe enzyme-substrat, AH = donateur d'hydrogène (gaïacol), P = produit formé (polygaïacol), k<sub>1</sub> étant la constante de vitesse de la formation du complexe enzyme-substrat (réaction 1), et k<sub>4</sub> la constante de vitesse de la réaction entre le complexe enzyme-substrat et le donateur d'hydrogène (réaction 2).

La vitesse d'utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépend des concentrations respectives du substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et du donateur d'hydrogène (gaïacol).

En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le gaïacol (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.OH.OCH<sub>3</sub>) est oxydé en polygaïacol, qui est, suivant les auteurs, soit le tétragaïacol [6], soit le digaïacol [7]. Booth et Saunders [7] ont isolé le digaïacol (2 : 2'-dihydroxy-3 : 3'-diméthoxydiphényl), en tant que produit principal de cette réaction.

Il nous a paru préférable de faire agir différentes concentrations d'INH et de D-cyclosérine sur une même solution de peroxydase, plutôt que d'augmenter constamment la concentration de la peroxydase, afin que la réaction soit complète, dans tous les cas, en trente secondes environ. Dans ce dernier cas, les résultats seraient difficilement comparables, puisque, pour une même concentration d'INH ou de D-cyclosérine, leur action pourrait être plus ou moins prononcée suivant la concentration de la peroxydase.

Nous avons donc appliqué ce procédé [6] en tant que moyen permettant de mieux préciser la sensibilité de l'action de l'INH et de la D-cyclosérine sur la peroxydase, dans les conditions prévues pour la détermination de k<sub>1</sub> et de k<sub>4</sub>, et non en tant que moyen de calcul de ces constantes (destinées surtout à la détermination de la concentration de l'enzyme dans les solutions non titrées).

Outre la peroxydase purifiée et, éventuellement, l'INH et la D-cyclosérine, les cuves du spectrophotomètre contiennent, pour un volume total de 3 ml :

k<sub>1</sub> : 0,8 ml de tampon phosphate 0,01 M, pH 7 ; 2 ml de gaïacol 0,02 M (1,3  $\times$  10<sup>-2</sup> M) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,3  $\times$  10<sup>-5</sup> M (ajoutée au temps 0).

k<sub>4</sub> : 2,8 ml de tampon phosphate 0,01 M, pH 7 ; 0,05 ml de gaïacol 0,02 M (3,3  $\times$  10<sup>-4</sup> M) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,3  $\times$  10<sup>-4</sup> M (ajoutée au temps 0).

Les mesures sont faites à la température de 20°.

L'activité de la peroxydase purifiée, ainsi que l'activité peroxydasique des Mycobactéries et de leurs extraits (surnageant de broyat obtenu après centrifugation de vingt minutes à 20 000 *g*, à 0°) est mesurée également suivant la méthode de Willstätter et Stoll [8], modifiée par Sumner et Gjessing [9]. Cette méthode est basée sur l'oxydation du pyrogallol [ $C_6H_3(OH)_3$ ; donateur d'hydrogène] en purpurogalline, en présence de  $H_2O_2$  et de la peroxydase.

Le nombre de milligrammes de purpurogalline formée par milligramme d'enzyme en cinq minutes, à 20°, correspond à « P. Z. » (Purpurogallin Zahl de Willstätter), l'activité de la peroxydase étant fonction de la quantité de purpurogalline formée.

Rappelons qu'au cours de l'isolement de la peroxydase on exprime en P. Z. l'activité des homogénats et de leurs différentes fractions, indépendamment du fait qu'ils soient plus ou moins chargés d'impuretés. Il nous a donc paru possible d'exprimer en P. Z. l'activité des bactéries broyées ou même intactes. Dans le premier cas le P. Z. correspond à 1 mg, en poids sec, de surnageant de broyat bacillaire; dans le second cas à 1 mg (poids sec) de bactéries.

On place dans un ballon : 2 ml de pyrogallol (100 mg), 10 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 6 et 1 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 (dans nos expériences, 0,5 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 donne le même résultat). On ajuste la température du mélange à 20° et on introduit la peroxydase purifiée, ou les bactéries, ou leurs extraits, au temps 0, le volume total ayant été amené à 20 ml avec de l'eau bidistillée. La réaction est arrêtée, après cinq minutes exactement, avec 0,5 ml de  $SO_4H_2$  à 20 p. 100. La purpurogalline formée est extraite à l'éther (volume connu, mais variable suivant l'intensité de la coloration obtenue). On sèche soigneusement la solution étherée avec  $SO_4Na_2$  anhydre et on dose la purpurogalline à l'aide d'un électrophotomètre de Meunier, à 430  $\mu$ , en se référant à une solution titrée.

La durée de la réaction est prolongée à vingt minutes, avec addition complémentaire de 0,5 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 toutes les cinq minutes, dans le cas des bacilles paratuberculeux intacts qui possèdent généralement une assez forte activité catalasique, susceptible de détruire rapidement  $H_2O_2$  et donc de fausser complètement les mesures de leur activité peroxydasique, généralement très faible. Dans ces conditions, en évitant d'employer une trop grande quantité de bactéries, nous obtenons, par milligramme de bacilles, une quantité de purpurogalline environ deux fois supérieure à celle du P. Z. correspondant.

L'activité catalasique est mesurée dans les conditions exigées pour la détermination de Kat. f. : 0°,  $H_2O_2$  0,01 N, tampon  $PO_4KH_2 + PO_4Na_2H$  0,0067 M, pH 6,8 [10],  $H_2O_2$  étant dosée, soit par manganimétrie [10], soit au moyen du réactif au sulfate de titane [11]. La durée de l'expérience est de une heure pour les bacilles tuberculeux résistants à l'INH.

Les essais de détermination du type de l'inhibition sont faits d'après les indications de Lineweaver et Burk [12].

Le traitement des bactéries intactes, préalable aux expériences, est le même que précédemment [3]. Leurs broyages sont effectués à 0°, en présence de poudre de verre.



MATÉRIEL. — Les bactéries sont cultivées sur milieu de Löwenstein, additionné ou non d'INH ou de D-cyclosérine. Le degré de résistance obtenu correspond aux  $\mu\text{g}$  de ces substances inclus dans 1 ml du milieu.

La peroxydase purifiée, utilisée dans ce travail, est la peroxydase du raifort (« horse radish peroxidase »), purifiée et fournie par Washington Biochem. Corp. Les molarités indiquées sont établies d'après le poids de cette préparation ; le degré de pureté de l'enzyme peut être calculé ( $P. Z. = 220$ ) d'après les courbes et les tableaux figurant dans le texte.

L'INH et la D-cyclosérine, dont les formules sont données dans le texte, proviennent des Etablissements Hoffmann-La Roche.

## RÉSULTATS

### I. — EFFET DE L'INH ET DE LA D-CYCLOSÉRINE SUR L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE.

Les résultats des dosages spectrophotométriques (à 470  $m\mu$ ) du polygaïacol, produit par la peroxydase purifiée du raifort

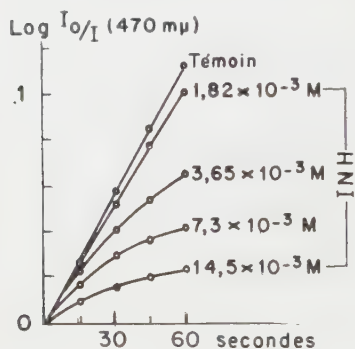


FIG. 1.

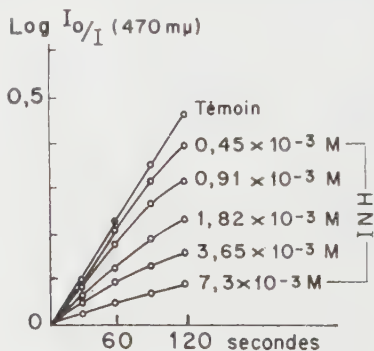


FIG. 2.

FIG. 1. — Conditions de détermination de  $k_1$

FIG. 2. — Conditions  $k_4$ .

Peroxydase purifiée  $0,8 \times 10^{-8}$  M. Sensibilité des réactions 1 et 2 à l'égard de différentes concentrations d'INH.

$0,8 \times 10^{-8}$  M, à partir du gaïacol et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en présence et en l'absence de différentes concentrations d'INH, sont donnés dans les figures 1 et 2 (conditions de détermination de  $k_1$  et  $k_4$  respectivement). L'inhibition de la formation (ou de l'accumulation) du polygaïacol peut donc être décelée, en une ou deux minutes, en présence d'INH  $1,82 \times 10^{-3}$  M ( $k_1$ ) ou même  $0,45 \times 10^{-3}$  M ( $k_4$ ). Avec une solution de peroxydase dix fois plus concentrée

( $8,6 \times 10^{-8}$  M), qui permet à la réaction de s'effectuer complètement en quarante secondes environ, cette inhibition (fig. 3) n'est perceptible qu'en présence de concentrations plus fortes d'INH ( $3,6 \times 10^{-3}$  M ou  $7,2 \times 10^{-3}$  M).

Pour une même molarité d'INH ou de D-cyclosérine l'inhibition est plus forte dans les conditions de détermination de  $k_4$  que dans celles de  $k_1$ .

Avec la peroxydase  $0,27 \times 10^{-8}$  M, et suivant ce même procédé, l'effet inhibiteur de la D-cyclosérine est net aux concentrations

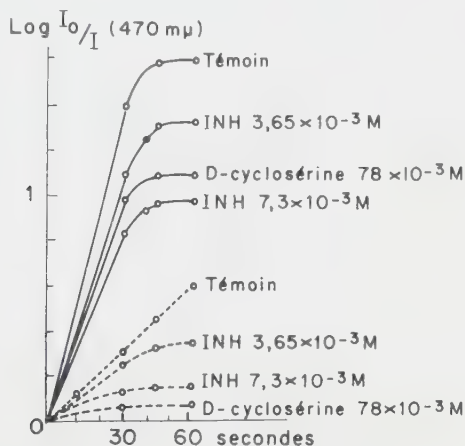


FIG. 3. — Action de l'INH et de la D-cyclosérine sur la formation et l'accumulation du polygaïacol (— conditions  $k_1$ , --- conditions  $k_4$ ).

de  $39 \times 10^{-3}$  M ( $k_1$ ) ou  $19,5 \times 10^{-3}$  M ( $k_4$ ). La D-cyclosérine  $19,5 \times 10^{-3}$  M n'influence pas la vitesse des réactions 1 et 2 pendant la première minute. Cependant, après cinq à dix minutes, la quantité trouvée de polygaïacol est inférieure de 50 p. 100 à celle du témoin. Dans les deux cas les courbes correspondant au polygaïacol accumulé ( $k_4$ ) restent, cependant, ascendantes dans ces conditions, la réaction n'étant complète pour le témoin qu'après vingt minutes environ.

Notons qu'à cette longueur d'onde (470 m $\mu$ ) il n'y a pas d'interférence optique entre l'INH, ou la D-cyclosérine, et le polygaïacol.

Dans certaines conditions on observe cependant le fait suivant : en présence d'une assez forte peroxydase ( $8,6 \times 10^{-8}$  M) et d'une forte quantité de D-cyclosérine ( $39 \times 10^{-3}$  M), la réaction (conditions  $k_1$ ) s'effectue avec une vitesse semblable à celle du témoin et s'achève en quarante-cinq secondes ; la densité optique baisse

ensuite et il se produit en cinq minutes une réduction de 90 p. 100 du polygaïacol formé.

Le produit de l'oxydation peroxydasique du gaïacol étant instable (notamment en présence de la D-cyclosérine) et cette méthode étant peu favorable à l'étude de l'activité peroxydasique des bactéries intactes et de leurs extraits, nous avons remplacé le gaïacol ( $C_6H_4.OH.OCH_3$ ) par le pyrogallol [ $C_6H_3(OH)_3$ ] et mesuré la formation de purpurogalline [8, 9]. La purpurogalline étant un produit stable, ce procédé nous a paru préférable pour étudier l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité peroxydasique proprement dite, tout en tenant compte des interférences secondaires éventuelles pouvant intervenir au cours du processus d'oxydation peroxydasique des phénols.

Les résultats obtenus avec des concentrations différentes de peroxydase purifiée du raifort, d'INH et de D-cyclosérine, employés séparément ou simultanément, sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Inhibition de la formation peroxydasique de la purpurogalline par l'INH et la D-cyclosérine employés séparément ou simultanément.

N°	Composition	mg de purpurogalline formée en 5 min. à 20°	% d'inhibition
1	Peroxydase purifiée $1,2 \times 10^{-8}$ M	2,25	
	" " + INH 250 $\mu$ g/ml ( $1,82 \times 10^{-3}$ M)	1,94	14
	" " + INH 500 $\mu$ g/ml ( $3,65 \times 10^{-3}$ M)	1,54	30
	" " + INH 1000 $\mu$ g/ml ( $7,3 \times 10^{-3}$ M)	1,17	48
	" " + INH 1500 $\mu$ g/ml ( $10,95 \times 10^{-3}$ M)	0,82	64
	" " + D-cyclosérine 500 $\mu$ g/ml ( $4,9 \times 10^{-3}$ M)	1,19	47
	" " + D-cyclosérine 500 $\mu$ g/ml + INH 250 $\mu$ g/ml	1,19	47
	" " + D-cyclosérine 1000 $\mu$ g/ml + INH 500 $\mu$ g/ml	0,63	72
2	Peroxydase purifiée $1,22 \times 10^{-8}$ M	2,39	
	" " + INH 500 $\mu$ g/ml ( $3,65 \times 10^{-3}$ M)	2,0	16
	" " + D-cyclosérine 500 $\mu$ g/ml ( $4,9 \times 10^{-3}$ M)	1,95	19
	" " + INH 500 $\mu$ g/ml + D-cyclosérine 500 $\mu$ g/ml	1,95	19
3	Peroxydase purifiée $0,6 \times 10^{-8}$ M	1,12	
	" " + INH 500 $\mu$ g/ml ( $3,65 \times 10^{-3}$ M)	0,90	29
	" " + INH 500 $\mu$ g/ml ( $3,65 \times 10^{-3}$ M)	0,78	
	" " + INH 1000 $\mu$ g/ml ( $7,3 \times 10^{-3}$ M)	0,57	49
	" " + INH 1500 $\mu$ g/ml ( $10,95 \times 10^{-3}$ M)	0,27	76
4	Peroxydase purifiée $0,6 \times 10^{-8}$ M	1,12	
	" " + D-cyclosérine 250 $\mu$ g/ml ( $2,45 \times 10^{-3}$ M)	0,85	24
	" " + D-cyclosérine 500 $\mu$ g/ml ( $4,9 \times 10^{-3}$ M)	0,73	35
	" " + D-cyclosérine 1000 $\mu$ g/ml ( $9,8 \times 10^{-3}$ M)	0,68	39
	" " + D-cyclosérine 1500 $\mu$ g/ml ( $14,7 \times 10^{-3}$ M)	0,42	63

Ainsi, la formation peroxydasique de la purpurogalline est inhibée par l'INH et par la D-cyclosérine. Pour une même molarité (tableau II), l'action de l'INH semble être supérieure à celle de

la D-cyclosérine. Cette différence est, cependant, nettement plus faible à la suite d'une réaction avec le pyrogallol (cinq minutes), que d'une réaction avec le gaïacol (une minute).

TABLEAU II. — Action comparée de l'INH, de la D-cyclosérine et d'autres substances sur la peroxydase purifiée du raifort.

	MG DE PURPUGALLINE FORMÉE EN 5 MN à 20°	POURCENTAGE D'INHIBITION
Peroxydase purifiée $1,5 \times 10^{-8}$ M . . .	2,7	
Peroxydase + D-cyclosérine 18 $\mu$ M/ml . .	1,0	62
Peroxydase + DL-sérine 36 $\mu$ M/mg . . .	2,6	0
Peroxydase + INH 7,2 $\mu$ M/ml . . . . .	1,6	41
Peroxydase + INH 18 $\mu$ M/ml . . . . .	0,8	70
Peroxydase + INH 18 $\mu$ M/ml + albumine bovine (fraction V) 3 mg/ml . . . . .	0,9	70
Peroxydase + acide isonicotinique 10 $\mu$ M/ml . . . . .	2,6	0
Peroxydase + acide isonicotinique 20 $\mu$ M/ml . . . . .	2,7	0
Peroxydase + hydrazine 7,2 $\mu$ M/ml . . .	0,5	81
Peroxydase + hydrazine 18 $\mu$ M/ml . . .	0,2	93
Peroxydase + hydrazine 18 $\mu$ M/ml + acide isonicotinique 20 $\mu$ M/ml . . .	0,2	93
Peroxydase + azoture de Na ( $N_3Na$ ) 7,2 $\mu$ M/ml . . . . .	0,4	82
Peroxydase + azoture de Na 18 $\mu$ M/ml . .	0,3	89
Peroxydase + hydroxylamine 7,2 $\mu$ M/ml .	0,8	70
Peroxydase + hydroxylamine 18 $\mu$ M/ml .	0,5	81
Peroxydase + nicotinamide 18 $\mu$ M/ml . .	2,5	0
Peroxydase + INH 18 $\mu$ M/ml . . . . .	0,8	71

Le pH de toutes les substances étudiées est ajusté à 7.

Comme nous l'avons vu précédemment [3], l'inhibition de la catalase est, au contraire, nettement plus forte par la D-cyclosérine que par l'INH. Cependant, comme pour la catalase, l'action conjuguée de ces deux substances (tableau I, exp. 1 et 2) sur la formation peroxydasique de la purpurogalline correspond approximativement à la valeur la plus basse obtenue avec l'un de ces inhibiteurs et non à la somme des deux actions mesurées séparément.

S'agit-il d'une interférence secondaire des substances étudiées avec le substrat ( $H_2O_2$ ), ou le donateur d'hydrogène (pyrogallol), ou le produit de la réaction (purpurogalline), interférence influençant éventuellement la formation ou l'accumulation de la purpurogalline sans action sur la peroxydase, ou bien s'agit-il d'une inhibition de la peroxydase ?

Dans nos conditions d'expériences il n'y a aucune décomposition de  $H_2O_2$  par l'INH ou la D-cyclosérine.



D'autre part, les dosages de  $H_2O_2$  (effectués suivant le procédé, très sensible, au sulfate de titane [11]) nous ont montré que, même en trente minutes à  $20^\circ$ , il n'y a aucune disparition de  $H_2O_2$  en présence de la peroxydase  $1,5 \times 10^{-8}$  M et de l'INH ou de la D-cyclosérine à la concentration de 1 ou 5 mg/ml. Dans nos expériences, contrairement au pyrogallol, ni l'INH ni la D-cyclosérine ne servent donc de donateurs d'hydrogène.

Par contre, en présence de  $H_2O_2$  (0,05 p. 100) il se produit, entre le pyrogallol (5 mg/ml) et l'INH (5 mg/ml), une interaction spontanée qui se manifeste par l'apparition d'une légère coloration rouge orangé. Cette interaction est nettement catalysée par la catalase et surtout par la peroxydase (apparition d'une coloration rouge orangé foncé). Lorsqu'on remplace, dans les mêmes conditions, l'INH par l'hydrazine (neutralisée), on n'observe aucune réaction colorée. En revanche, l'acide isonicotinique (neutralisé) donne lieu à la réaction colorée observée avec l'INH. Lorsqu'on remplace la peroxydase purifiée par des bacilles tuberculeux, l'intensité de cette réaction secondaire varie dans de larges limites avec les souches.

En présence de  $H_2O_2$  (0,05 p. 100), il n'y a pas de réaction colorée spontanée entre le pyrogallol (5 mg/ml) et la D-cyclosérine (5 mg/ml). Cependant, une coloration rose apparaît en présence de la catalase, et une coloration rouge foncé en présence de la peroxydase.

Comme dans le cas de l'INH, la substance colorée n'est pratiquement pas soluble dans l'éther et n'interfère donc pas avec la purpurogalline. On élimine par  $SO_4Na_2$  anhydre qui les adsorbe les traces de cette substance rouge entraînée avec l'eau dans la phase étherée.

En présence de  $H_2O_2$  et de la peroxydase, et en l'absence de pyrogallol, on n'observe aucune réaction colorée, ni avec l'INH, ni avec la D-cyclosérine.

Est-il possible que le pyrogallol, à la suite de l'interaction avec l'INH ou avec la D-cyclosérine, se trouve éventuellement en quantité insuffisante pour assurer le rendement normal du système en purpurogalline ?

En diminuant fortement les concentrations d'INH et de D-cyclosérine (1 mg/ml, par exemple) et en portant la concentration de pyrogallol à 10 mg/ml, au lieu de 5 mg/ml prévus par le procédé [9], on obtient une même quantité de purpurogalline formée, c'est-à-dire une même inhibition par rapport aux témoins. Dans nos conditions d'expériences, nous nous trouvons donc dans tous les cas en présence d'un excès de pyrogallol.

D'autre part, il reste évidemment une quantité suffisante d'INH, ou tout au moins de la partie active de sa molécule,

puisque l'inhibition de la formation peroxydasique de la purpurogalline a lieu malgré la disparition partielle de l'INH résultant de l'interaction signalée. En outre, il n'est pas exclu que, dans ces conditions, puisse apparaître une combinaison intermédiaire (entre le pyrogallol et la partie isonicotinique de la molécule d'INH), possédant, comme dans l'INH, le groupement hydrazide libre et, par conséquent, comme nous le verrons plus loin, actif à l'égard de l'enzyme.

Si, d'autre part, après cinq minutes, on arrête ou ralentit fortement la réaction, par addition d'INH ou de D-cyclosérine ( $> 2,5$  mg/ml) à la place de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , et si on laisse la purpurogalline formée en contact avec ces substances pendant cinq à quinze minutes avant son extraction à l'éther, on n'observe pas de baisse de la quantité de purpurogalline extraite, par rapport au témoin traité suivant le procédé habituel [9]. Entre l'INH et la D-cyclosérine d'une part, et la purpurogalline d'autre part, il n'y a donc pas d'interaction susceptible d'en abaisser le taux dans la mesure indiquée au tableau I.

N'ayant pas observé d'interférences secondaires susceptibles d'expliquer, dans nos conditions d'expériences, l'inhibition de la formation, ou de l'accumulation, de la purpurogalline par l'INH et par la D-cyclosérine, nous pensons donc qu'il s'agit là d'une inhibition réelle de la peroxydase par ces substances.

Comme la peroxydase du raifort, l'activité peroxydasique des bacilles tuberculeux et de leurs extraits est également inhibée par l'INH et la D-cyclosérine.

La souche H37Ra sensible, âgée de 19 jours, laissée en contact avec l'INH (20 mg/ml) pendant trente minutes à  $37^\circ$ , donne, en présence d'INH, un P. Z. de 0,009, tandis que ces mêmes bactéries débarrassées de l'INH par six lavages à l'eau bidistillée donnent un P. Z. de 0,022, contre 0,025 pour le témoin. Notons que les bactéries H37Ra sensibles, lavées une fois à l'eau, possèdent un P. Z. analogue (0,023).

Dans tous les cas, le P. Z. de 0,020 correspond à environ 1 mg de purpurogalline obtenue, par expérience, avec 50 mg de bactéries.

La même souche, traitée de la même façon par la D-cyclosérine (2,5 mg/ml) à la place de l'INH, nous donne les résultats suivants : témoin : P. Z. = 0,024 ; en présence de la D-cyclosérine : P. Z. = 0 ; bactéries débarrassées de la D-cyclosérine par lavage : P. Z. = 0,018.

Il est donc évident que l'inhibition de l'activité peroxydasique, exercée aussi bien par l'INH que par la D-cyclosérine, est réversible.

D'autre part, les résultats des expériences concernant le type

de l'inhibition de la peroxydase purifiée par l'INH sont réunis dans la figure 4.

On sait qu'en présence d'un excès d'hémine libre les bacilles tuberculeux sensibles se multiplient dans un milieu de culture additionné d'INH [13]. Cet antagonisme pourrait résulter d'une destruction de l'INH catalysée par l'hémine, indépendamment du métabolisme microbien [23, 24], et non pas nécessairement de la formation d'un complexe INH-hémine libre ou INH-hémine enzymatique.

En effet, même si certaines expériences [25] suggéraient la possibilité d'une combinaison de l'INH avec l'hémine libre, rien ne

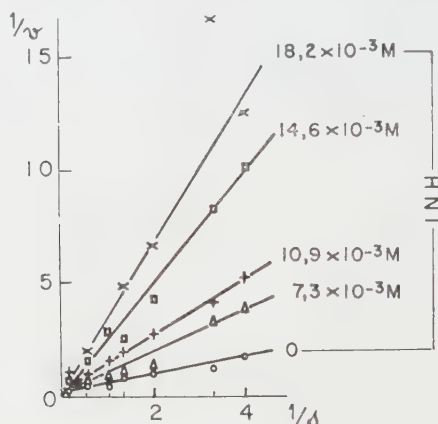


FIG. 4. — Inhibition compétitive de la peroxydase purifiée du raifort par l'INH.

Ordonnée : L'inverse de la vitesse  $\frac{1}{v}$ , où  $v$  = mg de purpurogalline formée en cinq minutes à 20° par la peroxydase purifiée du raifort  $1,6 \times 10^{-8}$  M.

Abscisse : L'inverse de la concentration du substrat  $\frac{1}{d}$  où  $s$  = ml de  $H_2O_2$  employée, comprise entre 0,03 et 0,0008 N.

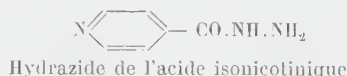
permettait de penser que l'hémine liée à une protéine d'enzyme ou de catalyseur transporteur d'électrons se combinerait également à l'INH, puisque l'antagonisme signalé entre l'INH et l'hémine libre n'existe pas entre l'INH et le cytochrome *c* [13].

La figure 4 montre que l'inhibition de la peroxydase du raifort purifiée par l'INH est du type compétitif. Ce fait impliquerait l'action de l'INH sur le groupe prosthétique de la peroxydase (formation d'un complexe INH-protohématine).

Cependant, à côté de cette action de l'INH sur le groupement catalytique de la peroxydase, il existe également une action,

inverse : la peroxydase catalyse la destruction (oxydation) de l'INH, par l'intermédiaire de ce même groupement hémínique.

L'INH étant une combinaison de l'hydrazine ( $\text{NH}_2 - \text{NH}_2$ ) avec l'acide isonicotinique :



nous avons étudié l'action, simple et conjuguée, de ces substances sur la peroxydase.

Comme le montre le tableau II, contrairement à l'INH, l'acide isonicotinique seul (neutralisé avec KOH), n'exerce pas d'effet sur l'activité peroxydasique. Pour obtenir l'inhibition de la peroxydase le groupement hydrazide ( $-\text{NH} - \text{NH}_2$ ) de la molécule est donc indispensable.

L'hydrazine hydratée (neutralisée avec HCl) inhibe la peroxydase purifiée aussi fortement que l'azoture de Na ( $\text{N}_3\text{Na}$ ), cette inhibition étant nettement plus forte que celle provoquée par l'INH de même molarité (tableau II). Dans le cas étudié, l'action de l'hydrazine libre est donc plus forte que celle de l'hydrazine substituée (hydrazide).

Par conséquent, en ce qui concerne la peroxydase, l'acide isonicotinique chimiquement lié à l'hydrazine (INH), non seulement ne renforce pas le pouvoir inhibiteur de l'hydrazine mais, au contraire, l'atténue. En revanche, l'acide isonicotinique libre n'influence pas l'action inhibitrice de l'hydrazine (tableau II).

Ces observations sont également valables en ce qui concerne l'inhibition de la catalase par l'INH.

Dans les deux cas (peroxydase, catalase) l'inhibition est obtenue même avec des quantités d'hydrazine nettement inférieures à  $10^{-3}$  M.

D'autre part, l'inhibition de la peroxydase par l'INH n'est pas entravée par l'albumine bovine (3 mg/ml de « fraction V »).

La D-cyclosérine :



(dont les hydrolysats contiennent de la D-sérine) inhibe la peroxydase en tant que dérivé cyclifié de la sérine, tandis que la sérine ( $\text{OH}.\text{CH}_2.\text{CH}.\text{COOH}.\text{NH}_2$ ) n'a pas d'effet sur l'activité peroxydasique (tableau II).



## II. — RÉSISTANCE A L'INH ET ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE DES MYCOBACTÉRIES.

Au cours d'un travail précédent [14], nous avons mis en évidence, et mesuré, l'activité peroxydasique chez certaines Mycobactéries pathogènes et saprophytes. Le faible P. Z. obtenu avec les bacilles intacts peut être augmenté avec les extraits bactériens (surnageant de broyat) concentrés par précipitation fractionnée au  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Les fractions comprises entre 0,4 et 0,8 de saturation donnent les P. Z. les plus élevés : 1 ou 1,5, dans certains cas. Or, on sait qu'au cours de la préparation classique de la peroxydase cet enzyme précipite en majeure partie dans ces mêmes conditions.

D'autre part, la catalase  $4 \times 10^{-9}$  M du foie de bœuf purifiée (Kat. f. 1400), qui a une activité catalasique supérieure à celle des bacilles tuberculeux et est susceptible de contenir des traces de peroxydase, ne produit, dans nos conditions de détermination du P. Z., que de très légères traces de purpurogalline, tandis que les bacilles tuberculeux (H37Ra, 50 mg en poids sec) en produisent 0,8 à 1 mg, et leurs extraits davantage. Dans certaines limites la quantité de purpurogalline formée est proportionnelle à la quantité de bactéries employées. Les mêmes bactéries chauffées quinze minutes à  $100^\circ$  ne produisent pas de purpurogalline.

En outre, l'addition d'éthanol (destiné à dévier, tout au moins partiellement, l'éventuelle activité peroxydasique de la catalase) n'influence pas le P. Z. des bacilles tuberculeux. C'est ainsi, qu'avec la souche H37Ra (40 mg de bactéries intactes, en poids sec), nous obtenons, dans les conditions de détermination du P. Z., 0,65 mg de purpurogalline, en présence comme en l'absence d'éthanol 0,02 M.

Si, d'autre part, nous employons simultanément la peroxydase purifiée fortement diluée et les bactéries (H37Ra), nous obtenons la quantité de purpurogalline qui correspond approximativement à la somme de ces deux activités peroxydasiques, mesurées séparément.

En outre, nos recherches de l'activité polyphénol-oxydasique chez les Mycobactéries (H37Ra, BCG, *M. phlei*) se sont révélées négatives. Le  $\text{Qo}_2$  de ces bacilles n'est pas influencé par le catéchol 0,01 M ; tandis que le DDC 0,04 M (diéthylthiocarbamate de Na, destiné à bloquer le Cu de la polyphénol-oxydase) exalte même leur respiration.

Ces faits, rapprochés de quelques observations qualitatives (dont certaines spectroscopiques) d'autres auteurs [15, 16, 17, 18], nous permettent donc d'envisager l'existence d'une faible per-

oxydase chez les bacilles tuberculeux et d'attribuer à cet enzyme la production de la majeure partie de la purpurogalline à partir du pyrogallol.

Le test au catéchol [ $C_6H_4(OH)_2$ ] est également positif dans le cas des bacilles tuberculeux.

Cependant, l'emploi du gaïacol comme donateur d'hydrogène ne nous a pas permis de mettre en évidence l'activité peroxydasique chez ces bactéries.

Afin d'éclaircir ce point, nous avons fait agir la peroxydase purifiée du raifort sur le gaïacol, en présence de  $H_2O_2$ . Nous avons vu que le produit d'oxydation fortement coloré ainsi obtenu (polygaïacol) se décolore lorsqu'on ajoute les bacilles tuberculeux non chauffés, qui ne l'adsorbent cependant pas. Dans les mêmes conditions les bactéries chauffées ne réduisent pas le polygaïacol, mais l'adsorbent nettement.

Si, d'autre part, on ajoute, toutes les cinq minutes, 0,1 ml de  $H_2O_2$  à 1 p. 100 dans une suspension de 5 à 10 ml de bacilles tuberculeux (H37Ra) non chauffés, contenant du gaïacol 0,02 M, on observe l'apparition d'une légère coloration fugace de polygaïacol, qui réapparaît après chaque addition de  $H_2O_2$ .

Il est donc évident que le polygaïacol ne peut s'accumuler parce qu'il est réduit par les bactéries au fur et à mesure de sa formation. Ce fait masque donc l'activité peroxydasique qui a lieu dans ces conditions.

Cette réduction est enzymatique. Nous ne savons pas encore s'il s'agit là d'une réductase spécifique nouvelle, ou d'un système réducteur non spécifique.

Nous avons signalé, précédemment [14], l'absence de l'activité peroxydasique chez les bacilles tuberculeux résistants à l'INH. Cette dernière observation, faite uniquement sur les bactéries intactes, a été d'ailleurs confirmée par Tirunarayanan et Vischer [19], suivant un test différent et uniquement qualitatif.

Les essais faits avec H37Ra et BCG 847, résistants à 300  $\mu$ g/ml et à 100  $\mu$ g/ml d'INH respectivement, montrent (tableau III) qu'aussi bien les bactéries intactes que leurs extraits (surnageant de broyat) sont dépourvus d'activités peroxydasique et catalasique. En revanche, les activités correspondantes (exprimées en P. Z. et Kat. f.) de H37Ra sensible à l'INH sont très nettes, tout en étant beaucoup plus fortes dans le cas des extraits que dans le cas des bactéries intactes. Dans chaque expérience, nous avons employé des quantités suffisantes de bactéries sensibles pour obtenir environ 0,8 à 1 mg de purpurogalline.

D'autre part, les cultures INH-résistantes de bacilles tuberculeux entretenues depuis plus d'un an en présence d'INH, et repiquées ensuite sur milieu dépourvu d'INH, conservent habituelle-

TABLEAU III. — Activité peroxydasique (P. Z.) et catalasique (Kat. f.) des bacilles tuberculeux résistants à l'INH ou à la D-cyclosérine et de leurs extraits.

	N°	Souche	Milieu	Age (jours)	P. Z.	Kat. f.
BACTERIES INTACTES	avirulentes	1 H37Ra.....	Lowenstein	19	0,023	0,86
		2 H37Ra résistant à 50 $\mu$ g/ml de D-cyclosérine...	"	19	0,020	2,6
		3 H37Ra résistant à 300 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	19	0	0
		4 BCG 847.....	"	19	0,014	0,39
		5 BCG 847 résistant à 100 $\mu$ g/ml de D-cyclosérine	"	19	0,009	0,44
		6 BCG 847 résistant à 100 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	19	0	0
	virulentes	7 H37Rv.....	"	21	0,009	0,40
		8 H37Rv résistant à 40 $\mu$ g/ml de D-cyclosérine...	"	21	0,009	1,2
		9 H37Rv résistant à 100 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	21	0	0
		10 Ravenel.....	"	21	0,02	0,34
		11 Ravenel résistant à 100 $\mu$ g/ml de D-cyclosérine	"	21	0,006	0,29
		12 Ravenel résistant à 100 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	21	0	0
Surnageant de broyat	13	H37Ra.....	"	19	0,048	4,6
	14	H37Ra résistant à 50 $\mu$ g/ml de D-cyclosérine...	"	19	0,058	5,7
	15	H37Ra résistant à 300 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	19	0	0
	16	BCG 847 résistant à 100 $\mu$ g/ml d'INH.....	"	19	0	0

ment leurs caractères de cultures INH-résistantes (avirulence, absence de catalase et de peroxydase).

Ce fait et un certain nombre d'autres observations permettent de penser qu'en présence d'INH il se produit, avant tout, une croissance sélective de mutants. On peut alors envisager, entre autres causes, que ces mutants seraient susceptibles de proliférer en présence de l'INH (c'est-à-dire être moins vulnérables ou résistants à l'INH), justement parce qu'il sont, contrairement aux bactéries sensibles, dépourvus de certains enzymes (catalase, peroxydase) que l'INH inhibe, et se sont adaptés à l'absence de ces enzymes.

Comme nous le signalons dans le chapitre précédent, la peroxydase purifiée est inhibée par le groupement hydrazide de la molécule d'INH, la partie correspondant à l'acide isonicotinique n'exerçant pas d'action sur cet enzyme.

Les tests que nous avons effectués, ainsi que les observations d'autres auteurs, montrent que le problème est plus complexe lorsqu'il s'agit de l'action de ces substances sur la croissance des bacilles tuberculeux. L'isonicotinamide [20], comme l'acide isonicotinique, n'a pas d'effet sur la reproduction de ces bactéries ; tandis que l'action inhibitrice de l'hydrazine hydratée est nettement plus faible que celle de l'INH [21]. L'hydrazide de l'acide nicotinique est pratiquement sans effet [21].

Il est donc évident que l'effet bactériostatique de l'hydrazine est très fortement augmenté par la partie isonicotinique de la

molécule d'INH. Un simple déplacement du groupement hydrazide dans la molécule entraîne l'abolition de son activité antituberculeuse (hydrazide de l'acide nicotinique), ou en réduit fortement le pouvoir (hydrazide de l'acide picolinique [22]). Il est cependant possible que ce fait soit dû, au moins en partie, à la différence de pénétration de ces hydrazides à l'intérieur des bactéries et que dans le cas de l'INH (produit très instable), la croissance sélective des bacilles résistants et leurs propriétés soient conditionnées également par l'hydrazine et non seulement par l'acide isonicotinique (impliquant la formation éventuelle d'isonicotinamide et d'iso-DPN [20]).

Le tableau III montre, d'autre part, comme on pouvait s'y attendre, qu'il ne suffit pas qu'une substance inhibe la catalase et la peroxydase pour qu'en sa présence les mutants dépourvus de ces enzymes puissent proliférer sélectivement, puisque les cultures résistantes à la D-cyclosérine (un autre inhibiteur de la catalase et de la peroxydase) possèdent les activités catalasique et peroxydasique. L'action de ces substances n'est pas spécifique et l'inhibition d'autres mécanismes peut interférer d'une façon décisive.

Comme le montre, en effet, le tableau III, contrairement aux bacilles (H37Ra) résistants à l'INH, les bacilles (H37Ra) résistants à la D-cyclosérine possèdent une activité peroxydasique assez semblable à celle des bacilles (H37Ra) sensibles, comparés à l'état intact, ou broyés.

D'autre part, une souche de BCG 847 résistante à 250 µg/ml d'INH (n'ayant pas d'activité peroxydasique, ni catalasique), adaptée ensuite à 50 µg/ml de D-cyclosérine et devenue résistante à la fois à l'INH et à la D-cyclosérine, ne possède aucune activité peroxydasique, ni catalasique.

Contrairement aux observations de Tirunarayanan et Vischer[19], et conformément à nos observations antérieures [14] étendues à un plus grand nombre de souches, nous montrons dans le tableau IV que les bacilles paratuberculeux saprophytes possèdent une faible activité peroxydasique. Dans certains cas, l'activité peroxydasique des bacilles paratuberculeux saprophytes est tout à fait semblable à celle des bacilles tuberculeux avirulents ou virulents. Dans le cas de la plupart des souches étudiées il apparaît, cependant, que l'activité catalasique des bacilles paratuberculeux saprophytes est supérieure, et l'activité peroxydasique inférieure, à celles des bacilles tuberculeux.

Les expériences faites avec *M. phlei* 525 et *M. milch*, en présence et en l'absence d'éthanol 0,02 M, donnent les mêmes quantités de purpurogalline formée (respectivement 0,28 mg/13 mg de bactéries et 0,21 mg/17 mg de bactéries, en vingt minutes). D'autre part, il n'y a aucun parallélisme entre l'intensité de



TABLEAU IV. — Activité peroxydasique et catalasique des bacilles paratuberculeux saprophytes.

N°	Souche	Milieu	Age (Jours)	mg de purpurogalline formée en 20 min. à 20°, par 10 mg (poids sec) de bactéries	Kat. f.
1	<i>M. phlei</i> 525.....	Lowenstein	7	0,170	3
2	<i>M. phlei</i> 525 résistant à 2000 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	0	0,44
3	<i>M. phlei</i> I. P. ....	"	6	0,090 (P. Z. = 0,005)	2,2
4	<i>M. phlei</i> I. P. résistant à 3000 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	0	0,25
5	<i>M. Grassberger</i> .....	"	6	0,130 (P. Z. = 0,006)	
6	<i>M. Grassberger</i> résistant à 1000 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	0	
7	<i>M. lacticola</i> .....	"	5	0,120	2,8
8	<i>M. lacticola</i> résistant à 500 $\mu$ /ml d'INH.....	"	5	0,040	0,38
9	<i>M. smegmatis</i> .....	"	6	0,160	0,7
10	<i>M. smegmatis</i> résistant à 2000 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	< 0,010	0,4
11	<i>M. ranae</i> .....	"	6	0,080	3,3
12	<i>M. ranae</i> résistant à 1000 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	< 0,010	0,55
13	<i>M. pellegrini</i> spontanément résistant à 100 $\mu$ /ml d'INH.....	"	6	0,070 (P. Z. = 0,004)	3,5
14	<i>M. pellegrini</i> résistant à 2000 $\mu$ /ml d'I. N. H. ....	"	6	0,010	0,43
15	<i>M. Milch</i> .....	"	7	0,160	1,1
16	<i>M. Milch</i> résistant à 500 $\mu$ /ml d'INH.....	"	7	0	0,1
17	<i>M. Carton</i> .....	"	7	0,080	0,24
18	<i>M. Carton</i> résistant à 500 $\mu$ /ml d'INH.....	"	7	0	0
19	<i>M. Yellow</i> spontanément résistant à 100 $\mu$ /ml d'INH.....	"	7	0	0,23
20	<i>M. Accra</i> 11,114 spontanément résistant à 100 $\mu$ /ml d'INH.....	"	8	0	0,05
21	<i>M. Accra</i> 01,04.....	"	9	0,110	0,9
22	<i>M. Kopylak</i> .....	"	8	0,230	1,3

l'activité catalasique et celle de l'activité peroxydasique de ces bactéries (par exemple, *M. phlei* 525 : Kat. f. = 3 ; milligramme de purpurogalline formée par 10 mg de bactéries = 0,17. *M. smegmatis* : Kat. f. = 0,7 ; milligramme de purpurogalline = 0,16). Malgré la très faible activité peroxydasique des bacilles paratuberculeux, il ne semble pas, par conséquent, qu'elle puisse être attribuée à leur catalase seule. En outre, nous n'avons pas trouvé d'activité polyphénol-oxydasique (catéchol, DDC) chez *M. phlei*.

Comme les bacilles tuberculeux, les bacilles paratuberculeux saprophytes, résistants à l'INH et entretenus pendant plus de six mois sur l'INH, ne manifestent qu'une activité peroxydasique négligeable ou nulle, leur activité catalasique étant également nettement affaiblie par rapport aux souches sensibles. Ainsi, avec la souche *M. Carton* résistante à l'INH, 3 p. 100 seulement de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 N ont été décomposés par 40 mg (poids sec) de bactéries en quatre-vingt-dix minutes, à 20°.

Comme nous l'avons montré, d'autre part, sur *M. phlei* [5, 14] l'activité peroxydasique des cultures INH-résistantes peut être pratiquement nulle, quand leur activité catalasique est encore nette, bien qu'affaiblie, par rapport à la souche-témoin.

Cependant, contrairement aux bacilles tuberculeux, pour obtenir ces résultats il est souvent nécessaire d'entraîner et d'entretenir

ces souches sur des quantités bien plus fortes d'INH, certaines souches de bacilles paratuberculeux pouvant être spontanément résistantes à 100 µg/ml d'INH, ou plus.

#### CONCLUSIONS.

1° L'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) et la D-cyclosérine inhibent la peroxydase purifiée du raifort (« horse radish »), ainsi que l'activité peroxydasique des Mycobactéries. Certaines caractéristiques de ces inhibitions sont données.

L'acide isonicotinique libre n'inhibe pas la peroxydase. En revanche, l'hydrazine ( $< 10^{-3}$  M) l'inhibe aussi fortement que l'azoture de Na ( $\text{N}_3\text{Na}$ ). L'action inhibitrice de l'hydrazine liée à l'acide isonicotinique (INH) est nettement plus faible que celle de l'hydrazine libre. L'inhibition provoquée par l'hydrazine n'est pas influencée par l'acide isonicotinique libre.

2° L'activité peroxydasique de certaines souches de bacilles paratuberculeux saprophytes est tout à fait semblable à celle des bacilles tuberculeux avirulents et virulents. Cependant, dans le cas de la plupart des souches étudiées, l'activité catalasique des bacilles paratuberculeux saprophytes apparaît supérieure, et l'activité peroxydasique inférieure, à celles des bacilles tuberculeux.

Contrairement aux souches sensibles étudiées, les bacilles tuberculeux résistants à l'INH sont dépourvus d'activité peroxydasique, à l'état intact et même à l'état d'extract.

L'activité catalasique des bacilles paratuberculeux saprophytes fortement résistants à l'INH est nettement abaissée par rapport aux souches-témoins; leur activité peroxydasique est généralement nulle.

L'activité peroxydasique des souches étudiées de bacilles tuberculeux résistants à la D-cyclosérine (et sensibles à l'INH) est, par contre, semblable à celle des souches-mères.

L'acide isonicotinique n'inhibe pas la multiplication des bacilles tuberculeux. L'action inhibitrice qu'exerce l'hydrazine sur la multiplication de ces bactéries est nettement plus faible que celle de l'hydrazide de l'acide isonicotinique.

#### SUMMARY

##### ACTION OF ISONIAZID HYDRAZID AND D-CYCLOSERINE ON PURIFIED PEROXIDASE AND PEROXIDASE ACTIVITY OF TUBERCLE BACILLI.

1. INH and D-cycloserine inhibit horse radish purified peroxidase and peroxidase activity of Mycobacteria. Certain characteristics of this inhibition are described.

Free isonicotinic acid does not inhibit peroxidase, but hydra-

zine ( $< 10^{-3}$  M) inhibits it as strongly as does Na azid. The inhibitory capacity of hydrazine coupled with isonicotinic acid (INH) is markedly weaker than that of free hydrazine. The inhibitory activity of hydrazine is not modified by free isonicotinic acid.

2. The peroxidase activity of a few stains of paratubercle bacilli is identical to that of virulent and avirulent t. b. However, in most of the strains studied, the catalase activity of saprophytic paratubercle bacilli is more, the peroxidase activity less pronounced than that of t. b.

These findings concern sensitive strains. Isoniazide resistant t. b. (intact t. b. as well as extracts) do not show any peroxidase activity.

The catalase activity of highly isoniazide-resistant saprophytic paratubercle bacilli is markedly lower than that of control strains, their peroxidase activity is generally null.

On the contrary, the peroxidase activity of D-cycloserine-resistant (and isoniazide-sensitive) t. b. was the same as that of the original strain.

Isoniazid acid does not inhibit t. b. multiplication. The inhibitory activity of hydrazine on t. b. multiplication is markedly weaker than that of isonicotinic acid hydrazid.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 281.
- [2] ANDREJEW (A.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 695.
- [3] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 102.
- [4] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [5] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 767.
- [6] DEVLIN (T. M.), in CHANCE (B.) et MAEHLY (A. C.). *Methods in Enzymology*, édité par Colowick (S. P.) et Kaplan (N. O.), vol. II, p. 770. Acad. Press Inc. Publ., New York, 1955.
- [7] BOOTH (H.) et SAUNDERS (B. C.). *J. chem. Soc.*, 1956, **1**, 940.
- [8] WILLSTATTER (R.) et STOLL (A.). *Untersuchungen über Enzyme*, 1928, **1**, 414.
- [9] SUMNER (J. B.) et GJESSING (E. C.). *Arch. Biochem.*, 1943, **2**, 291.
- [10] EULER (von H.) et JOSEPHSON (K.). *Ann. Chem.*, 1927, **452**, 158.
- [11] PATTI (F.) et BONÉT-MAURY (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 1177.
- [12] LINEWEAVER (H.) et BURK (D.). *J. Am. chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
- [13] FISHER (M. W.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 797.
- [14] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 586.
- [15] FREI (W.). *Zbl. Bakt., I Orig.*, 1935, **134**, 26.
- [16] GIOLOTTI (G.). *Atti. Soc. Ital. Sci. vet.*, 1949, **3**, 547.

- [17] CHRISTOPHERSEN (J.). *Vorratspflege u. Lebensmittelforschung*, 1942, **5**, 372.
  - [18] LEMBKE (A.). *Zbl. Bakt., I Orig.*, 1948, **152**, 239.
  - [19] TIRUNARAYANAN (M. O.) et VISCHER (W. A.). *Am. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 62.
  - [20] ZATMAN (L. J.), KAPLAN (N. O), COLOWICK (S. P.) et CIOTTI (M. M.). *J. biol. Chem.*, 1954, **209**, 453.
  - [21] PERCHINE (G. N.) et NESVADBA (V. V.). *Biokhimia*, 1957, **22**, 804.
  - [22] HICKS (R. M.) et CYMERMAN-CRAIG (J.). *Biochem. J.*, 1957, **67**, 353.
  - [23] BÖNICKE (R.). *Naturwiss.*, 1954, **41**, 377.
  - [24] KNOX (R.), ALBERT (A.) et REES (G. W.). *Nature*, 1955, **175**, 1085.
  - [25] GRAY (C. T.). *Proc. VI<sup>e</sup> Cong. int. Microbiol.*, 1953, **1**, 179.
-

# **SUR LA FRÉQUENCE DES DIFFÉRENTS VIRUS ENTÉRIQUES ISOLÉS AU COURS DE L'ANNÉE 1957**

par J. MAURIN, M<sup>me</sup> J. VIRAT et M<sup>me</sup> M.-C. CARRÉ (\*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus [D<sup>r</sup> P. LÉPINE]*)

Des communications précédentes [1, 2] ont décrit l'isolement et la détermination du type antigénique des souches de virus poliomyélitique effectués dans le Service des Virus de 1953 à 1955. Nous nous proposons ici de compléter ces données, en particulier par l'étude des virus cytopathogènes isolés en 1957 sur cultures de cellules épithéliales de reins de singe.

Il s'agit dans la règle de virus isolés à partir d'extraits de matières fécales humaines. Un petit nombre d'essais d'isolement ont en outre été faits à partir de L. C.-R. ou de prélèvements de gorge.

## **MATÉRIEL ET TECHNIQUES.**

**INOCULAT.** — Les extraits de matières fécales peuvent être obtenus par deux procédés différents : l'extraction à l'eau et l'extraction à l'éther.

Nous n'employons l'extraction à l'eau que lorsqu'il est impossible de faire autrement, par exemple chez l'enfant quand on ne peut se procurer des selles et qu'on doit se contenter d'un écouvillonnage rectal. La centrifugation et l'addition d'antibiotiques assurent dans une certaine mesure la stérilité bactériologique.

L'extraction à l'éther, méthode plus sûre pour éviter les contaminations, est régulièrement employée. La technique est une modification de celle décrite en 1939 par P. Lépine [3].

On laisse le virus diffuser dans l'eau pendant la nuit à la glacière, et après une première centrifugation on traite à l'éther l'émulsion. L'éther évaporé, on centrifuge une deuxième fois, plus rapidement, et on ajoute des antibiotiques (1 000 U de pénicilline et 200 µg de streptomycine par ml), qu'on laisse agir pendant 24 heures avant d'inoculer l'extrait dans les cultures.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.



CELLULES. — Nous employons des cellules épithéliales de rein de singes africains *Cynocephalus babuin*. Les reins sont trypsinés dans un appareil à fonctionnement continu déjà décrit [4] et les cellules, lavées deux fois dans une solution de P. B. S. ou de Hanks, sont mises en suspension, à raison de 400 000 environ par ml, dans le milieu suivant :

Milieu dit de Parker (Connaught 199) simplifié	
suivant la formule du Service des Virus .....	50 %
Hanks .....	47 %
Sérum de poulain .....	3 %

La suspension cellulaire est répartie, à raison de 1 ml par tube, dans des tubes à essais de 14 × 140 mm bouchés au caoutchouc et mis à l'étuve à 37° en position inclinée. Le tapis cellulaire est généralement complet au bout d'une semaine et les tubes sont prêts à être inoculés.

ISOLEMENT. — Pour commencer, on introduit une certaine quantité d'extrait ou de liquide de prélèvement dans deux tubes de culture. Cette opération est nommée premier passage. En ce qui concerne les extraits de matières fécales, plusieurs techniques ont été utilisées à titre comparatif ; elles seront publiées d'autre part avec les résultats obtenus. Finalement nous avons retenu la suivante, qui nous a donné satisfaction sur le plan de la sensibilité, et qui présente sur les autres l'avantage d'une grande simplicité. Dans chacun des deux tubes, on met 0,3 ml d'extrait. Après quoi les tubes sont mis en position inclinée pendant 30 mn à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, on jette le vieux milieu mélangé d'extrait et on le remplace par 1 ml de milieu neuf.

Pour les liquides de lavage de gorge et les L. C.-R., nous nous contentons de renouveler les deux tubes et d'y ajouter 0,3 à 0,5 ml du prélèvement.

Dans tous les cas les tubes sont mis à l'étuve à 37° dans un appareil à tubes roulants. Au bout de 3 jours, on fait une première lecture. Si les deux tubes sont détruits, on fait immédiatement un deuxième passage (voir ci-dessous). Sinon, on les remet à l'étuve. Après 4 jours (c'est-à-dire 7 jours après l'inoculation) on procède à une deuxième lecture ; mais quel qu'en soit le résultat, on fait systématiquement un deuxième passage.

Le deuxième passage s'effectue très simplement en transférant à deux tubes neufs fraîchement renouvelés le mélange du liquide de culture des deux tubes du premier passage, à raison de 0,1 ml par tube. On peut aussi rejeter le milieu des tubes du deuxième passage, puis les inoculer et enfin remettre le milieu neuf. On

fait deux lectures comme pour le premier passage. Les tubes présentant un effet cytopathogène au second passage sont considérés comme positifs et soumis au typage. Les tubes restés normaux sont déclarés négatifs. En cas de doute on fait un ou plusieurs passages ultérieurs avant de typer.

**TYPAGE.** — Le virus utilisé pour les typages est le liquide de culture du deuxième passage après destruction complète des cellules. L'expérience nous a montré que la dilution au 1/100 de ce liquide donnait les meilleurs résultats.

Les sérums que nous employons sont des sérums de lapins préparés par plusieurs injections de virus poliomyélitique. Ils sont monovalents, et de titre élevé (1/640 au moins). On les inactive à 56° C pendant une demi-heure et on les conserve congelés après répartition en ampoules de 1 ml.

Pour l'exécution de la réaction, on mélange à parties égales le virus avec chacun des trois types de sérum antipoliomyélitique. Du virus dilué de moitié dans du milieu normal sert de témoin. Après un séjour d'1 h à l'étuve à 37°, les trois mélanges et les témoins sont inoculés chacun à deux tubes, ce qui donne huit tubes pour un typage. Le tout est mis à 37° dans un appareil à tubes roulants. On fait deux lectures, l'une après 48 h, l'autre après 72 h. La protection des cellules dans les deux tubes correspondant à un type de sérum, alors que tous les autres sont détruits, indique une neutralisation spécifique (virus poliomyélitique) et détermine le type de ce virus.

Si au contraire tous les tubes sont détruits, il ne s'agit pas d'un virus poliomyélitique, mis à part le cas d'un mélange de deux types différents de ce virus. En fait, cette dernière éventualité est rare et nous ne l'avons pas observée en 1957.

Dans quelques cas, la destruction des cellules n'étant pas complète dans les témoins, on est appelé à remettre les tubes à l'étuve pour 1 ou 2 jours. Rarement on n'obtient aucune destruction dans les tubes ; le typage est alors recommencé en prenant le virus à la dilution 1/10 ou même non dilué.

En effet, certains virus non poliomyélitiques ont un titre assez bas et ne peuvent être passés à la dilution 10<sup>-2</sup>.

## RÉSULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus en 1957 figurent dans le tableau I. Il y a eu **381** résultats positifs sur **1 471** examens pratiqués, ce qui donne un pourcentage de positivité de 25,9 p. cent.

Si maintenant nous considérons les cas d'isolement de virus poliomyélitique, en éliminant les virus indéterminés qui feront l'objet d'une étude ultérieure, nous retenons **350** souches qui se répartissent comme il est indiqué dans le tableau II.

TABLEAU I. — Résultats généraux.

Nombre d'examens pratiqués	Résultat négatif	Résultat positif			
		Polio I	Polio II	Polio III	Indéter- miné
1471	1090	312	23	15	31

TABLEAU II. — Répartition des types de virus poliomyélitique.

Résultats positifs polio	Type I	Type II	Type III	Total
Nombre	312	23	15	350
Pourcentage	89,1 %	6,6 %	4,3 %	100 %

L'interprétation de ces résultats et la comparaison avec les résultats obtenus antérieurement ont déjà fait l'objet d'une communication à l'Académie de Médecine [5]. Nous n'y reviendrons donc pas.

Mais, d'autre part, il nous a paru intéressant de grouper les cas positifs en fonction de l'atteinte clinique présentée par les sujets. Nous avons obtenu ainsi les éléments reproduits au tableau III. La catégorie « syndromes paralytiques » rassemble

TABLEAU III. — Répartition suivant le syndrome clinique.

	Type I	Type II	Type III	Total	Pourcentage total
Syndromes paralytiques	164	15	8	187	53,4 %
Syndromes méningés	62	4	4	70	20,0 %
Syndromes méningo- encéphalitiques	8	1	1	10	2,9 %
Syndromes fébriles	15	1	1	17	4,9 %
Contacts	31	1	1	33	9,4 %
(sans renseignements)	32	1	0	33	9,4 %
Total	312	23	15	350	

tous les cas où il y a eu une atteinte paralytique ou parétique, quels que soient les autres signes. Dans la rubrique « syndromes méningés » nous n'avons mis que les cas de formes méningées pures. La catégorie « syndromes méningo-encéphalitiques » n'appelle pas de remarque spéciale. La catégorie « syndromes fébriles » groupe les affections fébriles sans signes de localisation, ou avec localisation extra-nerveuse. Les contacts sont des formes inapparentes décelées dans l'entourage des malades par la recherche systématique du virus. Enfin, la rubrique « sans renseignements » désigne les cas où aucun renseignement clinique ne nous a été communiqué. Cependant, dans la plupart de ces cas, le simple fait d'avoir adressé au laboratoire des selles en vue de la recherche d'un virus indique que le diagnostic de poliomyélite était au moins envisagé par le clinicien.

★ ★

Comme nous l'avons dit, la très grande majorité des essais d'isolement a été faite à partir des extraits de selles. Les prélèvements de gorge ont été très peu nombreux : 9 en tout, sur lesquels 4 se sont révélés positifs.

Deux de ces derniers provenaient d'enfants voisins de lit, atteints tous deux d'une angine rouge. Les selles correspondantes ne nous ont pas été envoyées. Nous avons isolé deux souches de type I, qui sont classées avec les autres dans la catégorie « syndromes fébriles ». Dans chacun des deux autres cas où le prélèvement de gorge a été positif, on a isolé le même virus des selles du malade. Il s'agit d'un type I, chez un contact, et d'un type II dans un cas de poliomyélite paralytique.

Dans un des 5 cas de prélèvement de gorge négatifs, on a trouvé un virus type I dans les selles. Dans les quatre autres cas, les selles sont restées négatives elles aussi.

★ ★

A la demande des médecins, nous avons effectué encore 15 essais d'isolement à partir de liquides céphalo-rachidiens. Ils se sont tous révélés négatifs. On sait en effet que dans le cas des virus entériques (sauf pour certains types ECHO), le L. C.-R. est toujours très pauvre en virus, même dans les formes purement méningées de la poliomyélite.

★ ★

En conclusion, on peut dire que l'isolement des virus cytopathogènes à partir des selles de l'homme est devenu un examen

de routine. La proportion de virus non poliomyélitiques reste faible (8,1 %). Au sujet des virus poliomyélitiques, on peut remarquer qu'un pourcentage élevé de types I (près de 90 %) caractérise l'année 1957, année où précisément la morbidité poliomyélitique a été élevée.

#### RÉSUMÉ.

En 1957, il a été effectué dans le Service des Virus **1 471** essais d'isolement, chez l'homme, de virus entériques cytopathogènes. **381** souches ont été isolées, dont **350** poliomyélitiques et **31** non poliomyélitiques. Les premières se décomposent en 49,1 % de type I, 6,6 % de type II et 4,3 % de type III. Quatre souches ont été isolées à partir de la gorge et aucune à partir du L. C.-R. ; toutes les autres à partir des matières fécales. La prépondérance du type I coïncide avec une morbidité poliomyélitique élevée.

#### SUMMARY

##### INCIDENCE OF THE DIFFERENT ENTEROVIRUSES ISOLATED DURING THE YEAR 1957.

In 1957, 1 471 attempts to isolate cytopathogenic enteroviruses from man have been carried out in the Virus Department of the Pasteur Institute. 381 strains have been isolated : 350 poliovirus strains, 31 other enteric strains. The polio strains comprise : 49,1 % type I, 6,6 % type II, 4,3 % type III. Four strains have been isolated from the pharynx, none from cerebrospinal fluid ; the other ones have been found in stools. The high percentage of type I strains corresponds to a high morbidity index.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), BARSKI (G.), ENDO (M.) et BLUSSON (M<sup>me</sup> J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1954, **138**, 50.
  - [2] LÉPINE (P.), BARSKI (G.) et ROSSE-FOSSAT (M<sup>me</sup>). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1956, **140**, 145.
  - [3] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 573.
  - [4] BETZ (A.) et MAURIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 224.
  - [5] LÉPINE (P.), MAURIN (J.) et VIRAT (M<sup>me</sup> J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1958, **142**, 537.
-



## EFFET DE L'INSTILLATION CONJONCTIVALE DE VIRUS GRIPPAL CHEZ LE LAPIN ET CHEZ LA SOURIS

par Claude HANNOUN (\*).

(Institut Pasteur, Centre National de la Grippe  
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE)

Au cours d'expériences où nous injectons du virus grippal dans la chambre antérieure de l'œil du lapin [1], nous avons parfois constaté l'apparition d'un taux élevé d'anticorps chez les animaux utilisés. Ce phénomène n'étant pas constant, nous ne pouvions l'attribuer à l'effet du virus à l'endroit où nous cherchions à l'injecter et nous avons alors remarqué qu'il s'agissait toujours d'animaux chez lesquels l'injection avait été difficile : une partie de l'inoculum avait pu déborder dans le cul-de-sac conjonctival. Nous avons alors entrepris une série d'expériences pour déterminer si l'introduction de virus grippal sur la conjonctive pouvait provoquer l'apparition d'anticorps.

Nous avons donc pratiqué, chez des lapins adultes, des instillations bilatérales de virus grippal A (PR8) en déposant II ou III gouttes de diverses préparations de virus dans chaque œil, en répétant l'opération à des intervalles qui seront précisés plus loin. Des prises de sang d'essai étaient effectuées avant la première instillation et après la dernière de chaque série.

Le titre en anticorps de ces sérums était déterminé par l'épreuve de l'inhibition de l'agglutination après traitement au periodate. Les titres exprimés correspondent à l'inverse de la dernière dilution de sérum inhibant totalement l'agglutination de 0,5 ml d'une suspension à 0,5 p. 100 de globules rouges de poule par 4 unités agglutinantes de virus A (PR8). Un protocole identique était suivi chez la souris, qui recevait seulement une petite goutte de virus dans chaque œil.

Les souris étaient inoculées avec des lignées de virus adaptées soit à l'œuf, soit à la souris. L'immunité des souris était recherchée soit par une épreuve avec du virus inoculé par aérosol, soit par titrage des anticorps anti-hémagglutinants dans le sérum.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.

## A. — EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN.

1° *Instillations de virus vivant.* — Dans ces expériences le virus utilisé est simplement du liquide allantoïque infecté centrifugé, et titrant 1/5 120 (hémagglutination). Une expérience préliminaire comporta une série d'instillations quotidiennes durant six jours, suivie, après vingt jours de repos, d'une seconde série identique. Les titrages d'anticorps montrèrent (fig. 1) une apparition d'anticorps à un taux modéré après la première série et une augmen-

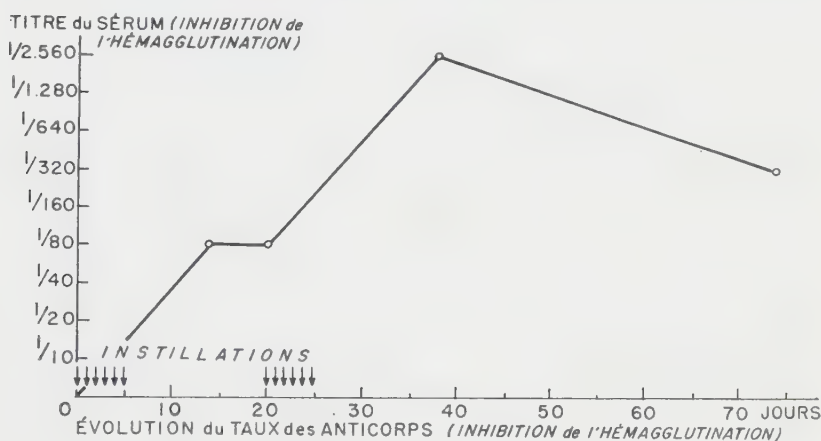


FIG. 1.

tation beaucoup plus considérable après la seconde. On trouvait encore un niveau élevé du taux des anticorps deux mois après la fin de la seconde série d'instillations.

Nous avons alors recherché l'effet d'instillations moins nombreuses mais plus espacées : deux lapins reçurent une instillation par semaine pendant quatre semaines, puis une instillation « de rappel » vingt jours après la dernière. Le tableau I (expérience 2) montre que les quatre premières instillations ont suffi à faire apparaître un taux d'anticorps considérable et que la cinquième n'a eu aucun effet favorable.

Dans une autre expérience, les lapins reçurent deux instillations par semaine, à vingt-quatre heures d'intervalle pendant quatre semaines, avec les résultats indiqués dans le tableau I (expérience 3). Le taux des anticorps s'est élevé rapidement pour baisser ensuite.

2° *Instillation de virus inactivé par le formol.* — Le virus instillé consiste en une préparation de liquide allantoïque centri-

TABLEAU I. — Taux des anticorps (inhibition de l'hémagglutination).

		AVANT	10 jours après la 4ème instillation	20 jours après la 4ème instillation	20 jours après la 5ème instillation
EXPERIENCE	2	LAPIN 21	< 10	5120	5120
		LAPIN 22	< 10	1280	640
=====					
		AVANT	15 jours après la 8ème instillation	25 jours après la 8ème instillation	
EXPERIENCE	3	LAPIN 26	10	640	160
		LAPIN 27	< 10	2560	1280
=====					
			AVANT	15 jours après la 2ème instillation	
EXPERIENCE	4	LAPIN 38 )	< 10	160	
		LAPIN 39 (virus inactivé	10	320	
		LAPIN 40 )	< 10	160	
		LAPIN 53 virus actif	< 10	2560	

fugé, additionné de 1/1 000 de formol puis conservé dix jours à +4°. Ce virus n'est plus infectant pour l'embryon de poulet mais agglutine encore à 1/5 120.

Les lapins reçoivent II gouttes de virus inactivé dans chaque oeil le premier jour ; huit jours plus tard on répète cette instillation. Un lapin témoin est traité de la même façon, mais avec du virus non inactivé. Les lapins sont saignés quinze jours après la seconde instillation. Le tableau I (expérience 4) montre que le virus inactivé est beaucoup moins antigénique par cette voie que le virus actif, mais qu'il provoque néanmoins l'apparition d'anticorps.

#### B. — EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS.

1° *Instillations de virus vivant.* — a) Dix souris reçoivent dans chaque oeil I goutte de virus vivant adapté à l'œuf titrant 10 unités agglutinantes au millilitre. Dix autres souris reçoivent I goutte de virus adapté à la souris et de titre équivalent. Quelques souris meurent d'infection grippale à la suite de ces instillations : avec le virus « souris », trois souris meurent les huitième, dixième et dixième jours. Les souris survivantes sont alors réinoculées pour la recherche de leur immunité.

Le tableau II montre que presque toutes les souris meurent, mais en un temps plus long que les témoins.

b) Dans une autre expérience, 20 souris reçoivent une dose plus forte de virus « souris » (100 u. HA/ml). Huit meurent entre le quatrième et le vingt-quatrième jour. Une moitié des survivantes est saignée le trentième jour, l'autre moitié le soixantième jour

TABLEAU II. — Résultat de l'inoculation d'épreuve des souris instillées.

	MORTALITÉ	DURÉE DE LA MALADIE EN JOURS
Témoins	10/10	4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6 (moy. 4.9)
Souris instillées avec le virus œuf	7/9	4, 6, 6, 7, 7, 7, 8, 8 <sup>x</sup> , 8 <sup>xx</sup> (moy. 6.4)
Souris instillées avec le virus souris	7/7	6, 6, 6, 6, 7, 7, 11 (moy. 7.0)

\* Sacrifiée le douzième jour : poumons hépatisés 100 p. 100 ; \*\* sacrifiée le douzième jour : pas de lésion.

pour permettre la recherche des anticorps dans leur sérum : cette recherche se révèle *négative* aussi bien par fixation du complément (antigène S) que par inhibition de l'hémagglutination.

Ces résultats montrent que le virus déposé sur la conjonctive peut infecter la souris, soit qu'il passe dans les voies respiratoires, soit que la conjonctive puisse être une porte d'entrée, mais que les souris survivantes ne présentent guère d'immunité puisqu'elles n'ont pas d'anticorps décelables et qu'elles meurent pratiquement toutes à la suite d'une réinoculation. Seul l'allongement net du temps de survie à la suite de cette réinoculation empêche de conclure à une absence totale d'immunité. De plus, deux souris instillées avec le virus œuf survivent à la réinoculation : l'une d'entre elles sans lésions était immunisée, l'autre avec des lésions importantes avait cependant pu survivre. Chez les souris instillées avec le virus souris, une meurt le onzième jour seulement, ce qui indique une immunité partielle.

En résumé, sur 20 souris, 4 meurent, 1 est totalement immunisée, 2 partiellement et 13 n'ont pratiquement aucune immunité.

2° *Instillation de virus inactivé.* — Trois expériences ont été réalisées avec du virus formolé ou glyoxalé [2] : une, deux et trois instillations à une semaine d'intervalle. Une seule souris meurt, d'une infection intercurrente, et les réinoculations donnent les résultats figurés sur le tableau III.

TABLEAU III.

	Une instillation		Deux instillations		Trois instillations	
	Mortalité	Temps moyen de survie	Mortalité	Temps moyen de survie	Mortalité	Temps moyen de survie
TEMOIN	10/10	6.6	10/10	5.9	10/10	5.9
VIRUS FORMOLE	9/10	6.1	10/10	5.1	9/10	5.8
VIRUS GLYOXALE	10/10	6.6	10/10	5.1	10/10	5.8

Les instillations de virus tué n'ont aucun effet immunisant chez la souris, puisque les animaux traités meurent pratiquement tous, et souvent même plus rapidement que les témoins.

### C. — DISCUSSION.

L'instillation de virus grippal frais sur la conjonctive provoque, chez le lapin, l'apparition d'anticorps inhibant l'héماغglutination jusqu'à des titres élevés. Les titres atteints sont de l'ordre de ceux obtenus habituellement pour la préparation des sérums témoins *par injection intraveineuse de 10 ml de liquide allantoïque brut* et saignée dix à quinze jours plus tard. Or, il suffit ici de quelques dixièmes de millilitre (lapin 53 : deux instillations de 0,1 ml dans chaque œil = environ 0,4 ml en tout) qui, injectés par voie intraveineuse, seraient incapables de déclencher une production aussi intense d'anticorps spécifiques. Par ailleurs, le virus inactivé, qui, du point de vue antigénique, se comporte par voie intraveineuse comme le virus actif, a ici une action infiniment moins efficace. D'autre part, la répétition des instillations ne semble pas améliorer les résultats quel que soit leur intervalle : on obtient pratiquement d'aussi bons résultats avec deux instillations espacées d'une semaine qu'avec douze instillations en deux séries de six injections en six jours.

Ces résultats permettent de préciser le mécanisme de la production des anticorps. Le fait que l'inactivation du virus empêche l'élaboration d'anticorps suggère que l'intervention d'un processus infectieux ou, tout au moins, d'une multiplication du virus est nécessaire pour l'élaboration de ces anticorps. Nous n'avons pourtant jamais pu observer, chez les lapins recevant le virus, ni réaction locale d'infection ou même l'irritation visible, ni lésion à l'autopsie. A peine avons-nous pu noter une très légère réaction thermique rapide et fugace : les lapins ayant reçu les instillations à 10 heures ont généralement 40° à 14 heures, pour revenir aux alentours de 39°5 à 18 heures. Il n'y a pas d'autre modification pendant les dix jours suivants ; il est pourtant intéressant de constater que le liquide allantoïque *normal* ne provoque aucune poussée thermique. Bien qu'il soit classique de considérer que le lapin n'est pas sensible au virus de la grippe, cette notion appelle cependant une réserve : essayant précisément d'adapter le virus grippal au lapin, et ceci sans succès, nous avions signalé l'existence, dans les frottis de poumon de lapin inoculé par voie trachéale, de cellules caractéristiques de l'infection par le virus grippal [3] retrouvées par la suite chez la souris [4], animal sensible. Ainsi, nous avons trouvé chez un animal non sensible (pas de maladie et surtout, pas de multiplication décelable du virus) des cellules visiblement infectées, traces au moins d'une



infection abortive ou atypique comme on en connaît d'ailleurs maintenant des exemples avec d'autres virus dans les cultures cellulaires. Il n'est donc pas possible d'éliminer formellement l'éventualité d'une infection ou d'une multiplication virale sous une forme peut-être particulière pour expliquer le phénomène que nous avons décrit.

L'immunisation par cette voie a d'ailleurs été démontrée chez le lapin avec d'autres types d'antigènes. Ramon et Richou [5], à la suite d'expériences d'Ehrlich et de Römer, montrèrent en 1935 que les instillations conjonctivales d'abrine, qui provoquent chez le lapin une forte conjonctivite, permettent d'immuniser l'animal contre cette substance, avec apparition d'anticorps circulants ; il en est de même pour les toxines diphtérique et staphylococcique, qui provoquent aussi une intense réaction inflammatoire, puis une immunisation. Avec la toxine diphtérique par exemple, six ou huit instillations, représentant des quantités suffisantes pour tuer le lapin par injection sous la peau, permettent d'obtenir l'immunité. Les mêmes substances, traitées par le formol et la chaleur, deviennent inoffensives et perdent en même temps leur pouvoir immunisant ; mais l'instillation simultanée d'anatoxine diphtérique et d'abrine active déclenche à la fois la réaction locale et la production d'antitoxine diphtérique. La réaction inflammatoire est donc nécessaire à l'immunisation. Ces expériences montrent que, pour immuniser par voie conjonctivale contre des antigènes non infectieux, il est nécessaire de provoquer une forte réaction de l'organisme : les antigènes instillés doivent posséder une certaine agressivité.

La souris, animal sensible, semble avoir un comportement très différent de celui du lapin : certains animaux s'infectent à la suite de l'instillation conjonctivale de virus avec, d'ailleurs, un mauvais rendement puisque 100 doses létales (par voie intranasale) instillées à des souris n'en tuent que 3 sur 10. Mais il n'y a pas ou presque pas d'infections inapparentes puisque l'on n'obtient pas d'immunité : il s'agit en somme d'un phénomène de tout ou rien. L'infection inapparente par le virus grippal existe pourtant bien chez la souris [6]. Le virus adapté à l'œuf et peu virulent pour la souris semble néanmoins un peu plus actif puisque, s'il tue moins de souris, quelques-unes cependant s'immunisent.

On a préconisé la vaccination antigrippale par voie intranasale avec un virus vivant mais peu virulent. Ce mode d'immunisation ferait apparaître une immunité tissulaire locale qui a pu être démontrée dans certains cas. L'existence d'infections virales à porte d'entrée conjonctivale pourrait de même inciter à créer une défense locale à cet endroit, dans les cas où cela est possible, par des applications de préparations de virulence atténuée. Pour

certain virus, en effet, la conjonctive est une porte d'entrée habituelle : le virus de la rougeole par exemple, pour lequel quelques auteurs vont jusqu'à considérer cette voie d'introduction comme la seule voie naturelle [7] ; les adénovirus qui, appliqués expérimentalement à des volontaires, sont plus efficaces et réguliers dans leurs effets par badigeonnages de la conjonctive palpébrale que par instillation intranasale ou inhalation [8] ; la fièvre jaune enfin qui, instillée sur la conjonctive, provoque une encéphalite chez la souris dans près d'un cas sur deux [9].

Les expériences sur la souris ne permettent pas de penser que la conjonctive est une porte d'entrée privilégiée pour le virus grippal, mais montrent qu'elle est une voie possible.

Un mode d'immunisation utilisant la voie conjonctivale a été préconisé récemment pour la prévention de la maladie de Newcastle chez le poulet [10] : l'instillation intra-oculaire de virus « incomplet » chez le poussin d'un jour donne d'aussi bons résultats que la vaccination par la méthode classique. Cette méthode combine l'utilisation d'un virus vivant mais peu infectant et l'introduction par voie conjonctivale. De même, Yoshida [11] rapportait en 1939 le résultat d'expériences de vaccination par le BCG instillé sur la conjonctive du cobaye : avec 25 traitements, on obtient après trois mois une prévention égale à celle produite par l'injection sous-cutanée, bien que la réponse allergique ne soit pas toujours parallèle. Dans ces cas encore, l'instillation ne peut avoir un effet immunisant que s'il ne s'agit pas d'un matériel inerte, mais d'une préparation contenant des éléments capables de multiplication, même si leur pouvoir pathogène est faible ou nul.

On peut donc se demander si l'instillation conjonctivale ne pourrait pas être un mode de vaccination par virus vivant atténué, utilisable contre la grippe ou d'autres maladies humaines à virus.

#### CONCLUSIONS.

L'instillation sur la conjonctive du lapin, animal peu sensible, de virus grippal actif provoque l'apparition dans le sérum de cet animal d'anticorps de titre élevé. La quantité de virus nécessaire pour obtenir ce résultat est faible par rapport à celle que l'on doit injecter par voie parentérale pour obtenir un niveau d'anticorps équivalent. Le virus inactivé, par contre, n'a qu'un pouvoir immunisant très faible par cette voie. Il semble donc que l'immunisation soit due à un phénomène actif, bien que le lapin ne présente aucun signe de maladie.

Chez la souris, animal beaucoup plus sensible, le virus adapté est moins pathogène par voie conjonctivale que par voie nasale, mais tue néanmoins un certain nombre de souris. Les souris survivantes sont cependant peu immunisées.

# SUMMARY

## EFFECT OF CONJUNCTIVAL INSTILLATION OF INFLUENZA VIRUS IN RABBITS AND MICE.

Rabbits receiving a conjunctival instillation of active influenza virus produce high titers of serum antibodies. The necessary amount of virus is low, and always lower than the amount required to obtain the same result by means of a parenteral inoculation. Inactivated virus, on the contrary, possesses but a very low immunizing capacity after conjunctival instillation. It seems then that immunization is due to an active phenomenon, although rabbits do not manifest any noticeable symptom or lesion.

In mice, mouse-adapted virus is less pathogenic after conjunctival instillation than after nasal inoculation; however, it kills a certain number of animals and the surviving mice have only a very low immunity.

The use of conjunctival inoculation of attenuated viruses as vaccines against diseases with a conjunctival mode of infection is suggested.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] HANNOUN (C.) et PRIETO (A.). [*Expériences non publiées*], 1957.
- [2] THOMAS (J. A.) et HANNOUN (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2258.
- [3] PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 691.
- [4] PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 338.
- [5] RAMON (G.) et RICHOU (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **54**, 518.
- [6] PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1470.
- [7] PAPP (K.). *Rev. Immunol.*, 1956, **20**, 27.
- [8] BELL (J.), WARD (T.), HUEBNER (R.) et ROWE (W.). *Am. J. pub. Hlth.*, 1956, **46**, 1130.
- [9] FINDLAY (G.) et CLARKE (L.). *J. Path. Bact.*, 1935, **40**, 55.
- [10] NADEL (M.) et EISENSTARK (A.). *Poultry Sci.*, 1955, **34**, 1298.
- [11] YOSHIDA (N.). *Tokyo Ijichinski*, 1939, **3142**, 16.

## LE POUVOIR INHIBITEUR DU SÉRUM VIS-A-VIS DU BACTÉRIOPHAGE T2 r + ET LA PROPERDINE

par J.-C. FRANCO, A. EYQUEM et N. GUYOT-JEANNIN (\*).

(Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie  
[Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

La properdine, qui a été mise en vedette à la suite des travaux de Pillemer, est le plus souvent évaluée par son aptitude à fixer le composant C'3 du complément hémolytique en présence de zymosan. On lui attribue d'autres propriétés, anti-bactériennes ou anti-virales. Son activité hémolytique pour les globules rouges tannés ou les globules de malades atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne, n'est pas suffisamment intense pour être décelée à de fortes dilutions du sérum et n'a donc pu être mise à profit. Son activité neutralisante pour *Shigella dysenteriae* et pour le virus de la maladie de Newcastle [9] a surtout servi à l'étude de sérums d'animaux.

Le pouvoir inhibiteur du sérum normal pour le bactériophage T2r+ a permis à Van Vunakis, J. Barlow et L. Levine [8] de proposer une technique de titrage. Ils ont ainsi observé que ce pouvoir est thermolabile à 56° et qu'il ne se manifeste qu'en présence des quatre composants du complément et de cations divalents.

La technique que nous utilisons a essentiellement pour base les premiers travaux de ces auteurs et a été adaptée aux besoins des études de biologie clinique, pour permettre un examen sélectif plus rapide d'un plus grand nombre d'échantillons.

Le titrage a été réalisé par la neutralisation du bactériophage T2r+ actif sur *Escherichia coli* B. Une suspension contenant  $2,5 \times 10^4$  particules, sous un volume de 0,5 ml, est mise en contact pendant soixante minutes à 37° avec des dilutions progressives (entre 1/5 et 1/50) de chacun des prélèvements à examiner ; les dilutions sont pratiquées sous un volume de 0,5 ml dans du tampon au véronal à pH 6,8 (0,124 mol.).

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 octobre 1958.

La neutralisation des particules des phages par les facteurs anti-phage est arrêtée par addition de 4 ml de tampon (pH 6,8) refroidi à 4° ; les particules de phages non inactivées sont titrées à l'aide d'une seule boîte de Petri pour chaque sérum. Les boîtes de Petri, dans lesquelles on a coulé de la gélose, sont inoculées, en excès, avec une culture de seize heures d'*E. coli* B, qu'on laisse imprégner pendant quinze minutes. Après aspiration de l'excédent on dépose à la pipette calibrée une goutte de 1/40 de millilitre de chacune des dilutions.

Chaque boîte reçoit VI gouttes à la périphérie et I goutte au

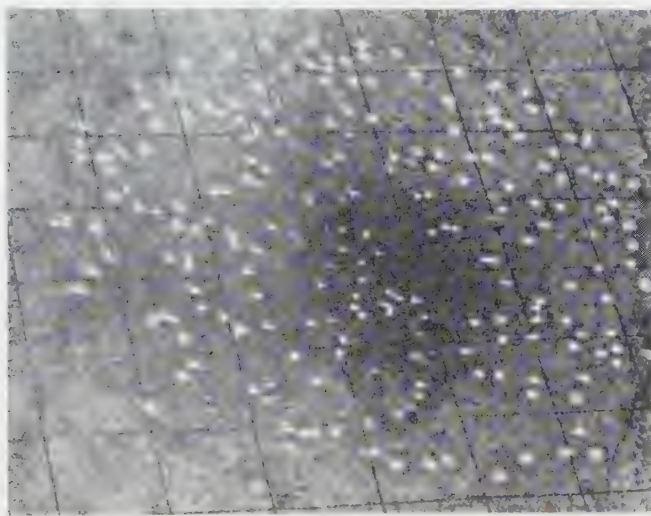


FIG. 1. — Image projetée d'une goutte contenant une cinquantaine de plages, correspondant aux phages non inactivés.

centre (provenant du tube témoin sérum chauffé). Les boîtes de Petri sont laissées durant trente minutes à 20° et vingt-quatre heures à 37°.

La numération des plages correspondant aux particules non inactivées est réalisée en chambre noire, après agrandissement de l'image ( $\times 50$ ) à l'aide d'un lecteur à microfilms. La numération est effectuée à l'aide d'un compteur électronique. La densité de la suspension de phage fournit en moyenne 100 particules pour 1/40 de millilitre de sérum témoins (fig. 1).

Le nombre d'unités contenues dans 1 ml de sérum frais est défini par l'inverse de la dilution correspondant à une neutralisation de 50 p. 100 des particules.



Cette technique permet d'examiner à la fois 30 à 50 échantillons de sérum ; ceux-ci doivent avoir été prélevés stérilement et conservés à  $-20^{\circ}$  ou  $-40^{\circ}$ .

Parallèlement a été déterminé, sur chacun des échantillons de sérum, le taux de properdine, selon la technique de Pillemer ou une technique simplifiée.

De plus, pour certains échantillons, nous avons effectué la détermination du taux de properdine inhibitrice de l'hémolyse, en différant de soixante minutes l'adjonction de R. P. jusqu'à la formation du complexe properdine-zymosan [2, 3, 6] et dans certains cas parallèlement sur le prélèvement de sérum soumis à l'ultracentrifugation à 30 000 *g*, pendant deux heures [2].

Les mêmes lots de R. P. et R3 et zymosan ont été utilisés tout au long de cette étude. Leur activité avait été vérifiée auparavant.

### RÉSULTATS.

SÉRUM HUMAIN. — Les résultats typiques de l'activité anti-phage des sérums normaux montrent qu'il n'y a pas de phénomène de zone pour les dilutions supérieures à 1/5.

Pour les adultes normaux, âgés de 20 à 25 ans, les titres anti-phage sont compris entre 15 et 50 unités par millilitre, la moyenne étant 25, et pour 85 p. 100 d'entre eux entre 18 et 33.

Le titre de la properdine inhibitrice de l'hémolyse est, pour ces mêmes sujets, compris entre 1 et 6 unités, 4 unités en moyenne (tableau I).

TABLEAU I.

#### Neutralisation du phage T2r+ par le sérum.

##### I.- SÉRUM HUMAIN NORMAL

N°	Nombre de plages comptées						Sérum chauffé	Nombre d'unités/ml
	Dilution du sérum							
	1/5	1/10	1/20	1/25	1/33	1/50		
13	5	19	46	63	68	101	106	22
16	8	26	64	90	97	116	100	18
20	2	29	85	101	108	107	99	15
35	2	5	12	27	40	66	127	50
2	0	0	4	18	26	50	100	50

##### II.- SÉRUM DE CHEVAL

N°	Dilution du sérum							Nombre d'unités/ml
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
632	16	82	102	110	141	188	179	8
76	186	180	218	190	191	219	201	2
748	168	152	179	169	200	191	193	2
106	21	23	39	59	80	98	154	32

Mais il est important de remarquer qu'il n'y a pas toujours correspondance exacte entre les deux déterminations pour un même échantillon.

SÉRUM DE CHEVAL. — Le tableau I donne un exemple des résultats de la neutralisation de T2r+ par le sérum de différents chevaux dont 1 normal (106) et 3 immunisés (632, 76, 748). Ces chevaux ont été immunisés pendant plusieurs semaines, la plupart vis-à-vis de l'anatoxine tétanique ou diphtérique et quelques-uns vis-à-vis d'*H. pertussis* et *E. rhusiopathiae*. L'étude de 84 chevaux immunisés a montré que le titre neutralisant était en moyenne de 4 unités. Il est compris entre 1 et 2 unités pour 50 p. 100 des animaux, entre 2 et 4 pour 25, entre 8 et 12 pour 25 p. 100. Au contraire, chez les chevaux normaux non immunisés, la valeur moyenne est de 18 unités.

L'examen de ces mêmes échantillons de sérum à l'aide de la technique d'inhibition de l'hémolyse a montré que le titre de la properdine sérologique était supérieur à 1 unité chez les animaux immunisés, alors qu'il était en moyenne de 4 unités chez les chevaux normaux.

Ces premières observations nous ont incités à poursuivre ces études comparatives sur des échantillons de sérums de malades atteints de différentes affections, notamment de rhumatismes inflammatoires chroniques et d'affections malignes.

L'ensemble des observations nous amène à conclure qu'il n'y a pas de corrélation absolue chez le cheval et chez l'homme malade, entre les résultats fournis par les deux méthodes. Par contre, chez l'homme normal, la corrélation est assez satisfaisante.

Cette opinion s'accorde avec des conclusions récentes de Barlow, Van Vunakis et Levine [1], qui ont remarqué, à l'examen de certains échantillons de sérum humain, une absence de corrélation entre des valeurs obtenues par les deux méthodes.

Il est, pour eux, possible que l'une des deux méthodes nécessite la présence de facteurs sériques différents des composants du complément ou de la properdine et du  $Mg^{++}$ . En général, d'après leurs observations, les valeurs neutralisant le bactériophage sont supérieures aux titres de la properdine déterminés par la technique sérologique ; dans certains cas, la présence d'inhibiteur doit être soupçonnée.

Nous nous accordons à considérer que la pente de l'inactivation du phage T2r+ est, chez l'animal, nettement différente de celle observée chez l'homme normal. Cette différence est surtout évidente pour le cheval. Il n'est pas impossible qu'elle soit attribuable aux caractères particuliers des facteurs du complément chez le cheval, dont l'activité hémolytique globale est très faible (Audran), 2 à 3 unités C', à opposer à 40-50 unités pour l'homme, vis-à-vis de différents systèmes hémolytiques, dont celui utilisé pour le dosage de la properdine.

Il est à remarquer que le facteur anti-phage présent dans le sérum de cheval garde en moyenne 50 p. 100 de son activité après trente minutes à 56°.

L'activité anti-phage est, en première analyse, assez largement indépendante des conditions de force ionique et de pH, surtout dans le cas du sérum de cheval.

Ce fait authentifie le phénomène de zone qui peut s'observer pour les dilutions de sérum inférieures à 1/5 car, avec le tampon au véronal utilisé, le pH 7 n'est atteint que pour les dilutions supérieures à 1/5.

#### RÉSUMÉ.

La technique d'étude de l'évaluation du pouvoir anti-phage permet d'examiner un grand nombre d'échantillons de sérum dans une même série et présente ainsi un certain intérêt pour la biologie clinique. Chez l'homme normal, le titre est compris entre 15 et 50 unités par millilitre, avec une moyenne de 25. Il n'y a pas de correspondance entre ces valeurs et celles obtenues par l'étude de l'évaluation sérologique de la properdine, par inhibition de l'hémolyse. Chez les chevaux normaux, le titre moyen du pouvoir anti-phage est de 18 unités, alors qu'il est de 4 unités chez 84 chevaux immunisés contre les anatoxines diphtériques ou tétaniques.

#### SUMMARY

##### INHIBITORY CAPACITY OF SERUM TOWARDS T2r+ PHAGE AND PROPERDINE.

With the study of the evaluation of anti-phage capacity, it is possible to examine a great number of serum samples in one series. This technique has then a certain importance in clinical biology. In normal humans, the titre ranges from 15 to 50 units per ml, with a mean value of 25. There is no correspondence between these values and those obtained by the study of properdin serological evaluation by means of hemolysis-inhibition. In normal horses, the mean titre of anti-phage capacity is 18 units, whereas it is 4 units in 84 horses immunized against diphtheria and tetanus toxoids.

★★

Nous sommes reconnaissants à Miss H. Van Vunakis, à L. Levine et à notre collègue, le Dr P. Nicolle, de nous avoir facilité cette étude.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARLOW (J. L.), VAN VUNAKIS (H.) et LEVINE (L.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 339 et 349.
  - [2] EYQUEM (A.). *VI<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hématol.*, Copenhague, 1957.
  - [3] EYQUEM (A.), FRANCO (J. C.) et DELMONTE (C.) [*sous presse*].
  - [4] EYQUEM (A.), FRANCO (J. C.) et GUYOT-JEANNIN (N.). *III<sup>rd</sup> Symposium of the Reticuloendothelial Society*, Rapallo, 1958.
  - [5] EYQUEM (A.) et TULLIS (J. C.). *Vox sanguinis, new series*, 1957, **2**, 61.
  - [6] KENT (J. F.), TOUSSAINT (A. J.) et HOOK (A. W.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1957, **96**, 676.
  - [7] LAURELL (A. B.) et GRUBB (R.). *Act. path. microb. scand.*, 1958, **43**, 310.
  - [8] VAN VUNAKIS (H.), BARLOW (J. L.) et LEVINE (L.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1956, **42**, 391.
  - [9] WEDGWOOD (R. J.), GLINSBERG (H. S.) et PILLEMER (L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 707.
-

## LES GROUPES SANGUINS DES LAPINS

par M<sup>me</sup> LILLE-SZYSZKOWICZ et A. EYQUEM (\*).

(Institut Pasteur,  
Centre d'Etude des Groupes sanguins des animaux  
[Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des groupes sanguins du lapin, mais le nombre des antigènes érythrocytaires existants reste encore mal défini, et il n'y a pas d'accord entre les différentes nomenclatures utilisées. Cette confusion, signalée récemment par Cohen, avait déjà été remarquée dans un exposé antérieur (Dujarric de la Rivière et Eyquem [15]). Elle apparaît, à l'examen du tableau, partiellement empruntée à une récente étude d'Anderson.

TABLEAU I.

Auteurs	Système de notation et fréquence des groupes				
Fischer et Klinkhart	A (6%)	B (15%)		nil	AB (79%)
Keeler et Castle	H <sub>2</sub> (44%)	H <sub>1</sub> (28%)		O (7%)	H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> (21%)
Fischer	K <sub>1</sub> (22%)	K <sub>2</sub> (19%)		O (1%)	K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> (48%)
Marcussen	Ka	Kb		nil	Ka Kb
Knopfmacher	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub>		H <sub>1</sub> H <sub>2</sub>	
Kellner et Hedel	g (17,7%)	G (26,5%)		nil	g G (56,7%)
Dahr et coll.	? r <sub>1</sub> (22%)	R <sub>1</sub> (13%)		?	? r <sub>1</sub> R <sub>1</sub> (60%)
Heard	Y	Z		W	YZ
Joysey	G <sup>b</sup>	G <sup>a</sup>		G <sup>c</sup>	G <sup>a</sup> G <sup>b</sup>
Cohen	A	F		D	AF
Anderson	A (19,3%)	B (52%)		O (5,7%)	AB (23%)
Lille-Szyszkowicz et Eyquem	A (16%)	B (36%)	C (4%)	O (8,8%)	AB (39,2%)

Les premiers travaux sur les hémagglutinines produites chez le lapin ont concerné l'élaboration des immunagglutinines correspondant aux antigènes érythrocytaires A, B, O ; certains lapins sont aptes à produire des anticorps vis-à-vis de l'antigène humain A. D'autres n'ont pas ce pouvoir, car ils possèdent une substance ayant une structure analogue à l'antigène humain A (von Dungern et Hirschfeld [16] ; Boyd et Feldman [6] ; Fischer [18]). Seuls les lapins ne possédant pas ces substances peuvent élaborer des anticorps vis-à-vis de l'antigène humain A. De plus, les globules et organes des lapins possèdent une substance absor-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 octobre 1958.



bant les iso-agglutinines anti-B du sérum humain (Fischer [18]; Boyd et Feldman [6]; Dujarric de la Rivière et Kossovitch [15 bis]).

Les antigènes érythrocytaires A et B, décrits par Levine et Landsteiner [30] ont été désignés par le symbole  $K_1$  et  $K_2$ , par Fischer [18], qui a de plus individualisé trois autres antigènes :  $K_3$ ,  $K_4$  et  $K_5$  permettant de distinguer 24 combinaisons antigéniques. Castle et Keeler [7] ont défini, plusieurs années après, deux antigènes G et g et n'ont pas trouvé de lapins du groupe O dont les érythrocytes n'étaient pas agglutinés par les iso-anticorps anti-G et anti-g. Ces antigènes G et g sont identiques, d'après les travaux de Joysey [25], aux antigènes Y et Z de Heard [22].

Trois isoagglutinogènes,  $R_1$ , r et  $R_2$ , ont été découverts par Dahr et Fischer [12]; ces agglutinogènes correspondent à ceux du système de Kellner et Hedel [27].

Par iso-immunisation Matsumoto et Watanabe [30 bis] ont obtenu quatre types d'anticorps spécifiques des antigènes A, B, C, D, pouvant être isolés ou associés chez le même animal. Le pourcentage des différents groupes était sur 150 lapins : D (32,47), A B C D (18,83), A B D et A C D (12,34), A D (5,84), C D (4,55), O (3,25), A, C et B C D (1,95); AB et BC (1,30), B, BD et ABC (0,65).

Trois antigènes principaux et différents caractères de classification moins certains ont été individualisés par Ivanyi et Tomaskova (23 bis).

Anderson a utilisé les lettres A, B, O, tandis que Helmbold [23] a utilisé les symboles romains de I à X.

L'un de nous, en collaboration avec E. M. Jochem, au cours d'une étude antérieure (1954) de ce problème, a observé la complexité d'action des iso-immunsérums obtenus. Au cours de ces examens, les globules rouges de certains lapins se sont révélés agglutinables par le sérum d'une forte proportion de lapins non immunisés (46 sur 48), alors qu'ils ne présentaient pas d'auto-agglutination. Ce phénomène, qui a été observé chez des lapins sains en apparence, a disparu en quelques semaines. Il ne nous a pas été possible de lui donner une explication satisfaisante et notamment de l'identifier au phénomène de Thomsen-Friedenreich. Le fait qu'il a coïncidé avec l'épidémie de myxomatose évoque néanmoins un mécanisme viral possible.

Cohen [40], qui s'est servi auparavant des symboles A, D, C, F, H, a souligné la nécessité d'une modification de la nomenclature. Il a constaté, de même que Joysey, que les antigènes érythrocytaires sont déterminés par trois gènes alléomorphes. La nomenclature proposée par Cohen [40] ( $HG^A$ ,  $HG^B$  et  $HG^C$ ) comprend le symbole H employé dès le début et la lettre g d'après Kellner [28], en tenant compte aussi des propriétés génétiques

des antigènes. Cohen propose d'utiliser une nouvelle lettre de l'alphabet pour chaque facteur découvert.

En dépit des difficultés résultant de l'absence d'une nomenclature uniforme, le lapin a été utilisé avec succès pour des expériences sur l'iso-immunisation et les conséquences pathologiques de l'incompatibilité des groupes sanguins (Keeler et Castle [26], Heard [22], Dahr [14], Anderson [4], Wright [33], Ivanyi [23 bis]).

Nos recherches ont eu pour but de choisir un certain nombre de lapins susceptibles de servir de modèles pour les expériences d'immuno-hématologie. La sélection des lapins devait être faite d'après leurs groupes sanguins.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Ne disposant pas de sérum agglutinant de référence, nous avons commencé par en tenter la production. A cet effet nous avons procédé à la sélection des animaux à immuniser en étudiant les iso-agglutinines « naturelles », et les immunagglutinines de cobaye anti-érythrocytes de lapin.

En recherchant les iso-agglutinines « naturelles », nous avons cru pouvoir déceler des différences antigéniques entre les érythrocytes de certains lapins.

Sur 80 échantillons de sérum examinés, nous en avons trouvé 3 avec des anticorps agglutinant les érythrocytes de certains lapins (n° 382, 376 ...). Ce fait, à lui seul suggérerait l'existence de groupes sérologiques. Avec les érythrocytes de ces deux groupes de lapins (groupe 377 et groupe 64), nous avons immunisé 6 cobayes par injections intrapéritonéales. Les sérums de cobayes ainsi obtenus ont été inactivés à 56° et débarrassés par absorption des hétéro-agglutinines, après contact avec des globules rouges de lapins du groupe 64 inagglutinables. Ces sérums, ainsi traités, ont agglutiné les érythrocytes de lapins avec lesquels les cobayes ont été immunisés, mais ils n'ont pas agglutiné les érythrocytes de plusieurs autres lapins.

#### IMMUNISATION DES LAPINS.

Huit lapins sélectionnés d'après les indications données ci-dessus ont été immunisés avec les érythrocytes de quatre autres lapins. Les érythrocytes (prélevés à la veine marginale en solution ACD) ont été lavés trois fois avant d'être injectés. Les lapins ont reçu, tous les trois jours, des doses allant de 0,5 à 3 ml de suspension érythrocytaire à 50 p. 100. On a effectué 6 injections. Les anticorps ont été recherchés et titrés après huit jours de repos. Une nouvelle série d'injections a été pratiquée par la

suite, de telle sorte que chaque lapin a reçu au total 12 injections. Les résultats des immunisations sont les suivants :

Sur 8 lapins immunisés, 2 (377 et 382) ont présenté des anticorps titrant de 1/4 à 1/16. Afin de relever le titre des anticorps, les immunisations ont été renouvelées en utilisant pour la première injection sous-cutanée l'adjuvant de Freund [21] (émulsion de l'adjuvant mélangé avec les globules rouges lavés, 0,5 ml). Par la suite, on a injecté dans la veine, tous les trois jours, la suspension érythrocytaire. Cette série d'immunisations a donné des résultats très favorables. Les titres agglutinants des sérums furent 1/512 (377 et 1/2048 (382) ; de plus, chez trois autres lapins (376, 371 et 382) sont apparues d'autres agglutinines distinctes des précédentes (tableau II).

TABLEAU II.

NOMBRE DES ANIMAUX	ANTICORPS	TITRE	NOMBRE DES INJECTIONS	ADJUVANT
8. . . . .	2	1/4-1/16	12	—
8. . . . .	5	1/2048	6	Adj. Freund
6. . . . .	3	1/512	6	BCG

Pour les injections suivantes, l'adjuvant de Freund a été remplacé, comme le suggère Cohen, par du BCG (Institut Pasteur), avec des résultats analogues.

De cette façon, nous avons pu confirmer les observations d'Anderson et Cohen, d'après lesquelles l'emploi d'adjuvant pour l'immunisation permet de relever le titre des anticorps immuns, et en même temps, de diminuer le nombre des injections.

#### TECHNIQUE.

Pour déterminer les groupes sanguins des lapins, nous avons utilisé toutes les techniques classiques d'agglutination. En raison de la fréquence de l'auto-agglutination, les érythrocytes examinés ont été mis en suspension dans une solution de sulfate de magnésium (3,3 p. 100) [Heard], ou dans leur propre sérum, d'après le procédé utilisé pour examiner les groupes sanguins humains.

A II gouttes de sérum, nous avons ajouté I goutte de suspension érythrocytaire (2 p. 100). La lecture a été pratiquée à l'aide d'un miroir concave, après une heure de séjour à la température de 36° et après centrifugation trente secondes à 1 500 t/m. Dans les cas d'absence d'agglutination nous avons pratiqué la réaction indirecte de Coombs (1) et recherché l'agglutination des érythrocytes trypsinés et papainés.

(1) Sérum de bouc anti-sérum de lapin, produit au Laboratoire des Groupes Sanguins de l'Institut Pasteur.

## RÉSULTATS.

Les sérums 371, 377 et 382 ont agglutiné les mêmes globules rouges (environ 40 p. 100). Les sérums 373 et 383 ont agglutiné environ 60 p. 100 des échantillons de sang examinés. Nous avons désigné par le symbole anti-A les anticorps contenus dans les sérums 371, 377 et 382, et par anti-B ceux contenus dans les autres sérums. Les antigènes érythrocytaires correspondant à ces anticorps ont été désignés par les symboles A, B, AB, O. Le sérum 382 agglutine, en outre, un certain nombre de globules qui ne sont pas agglutinés par les autres sérums. Nous avons désigné par le symbole C l'antigène correspondant à cet anticorps. Les anticorps anti-C peuvent être absorbés par les globules compatibles et peuvent en être élués. Après absorption, il ne reste dans le sérum 382 que l'anticorps anti-A, dont le titre est sensiblement plus élevé que celui des anti-C.

Nous avons constaté que les érythrocytes de certains lapins ne sont agglutinés par aucun des sérums examinés. Ces érythrocytes ont été nommés « O ».

Entre temps, nous avons reçu du D<sup>r</sup> Anderson de Glasgow, des sérums anti-A et anti-B, et du D<sup>r</sup> Cohen, les anti-A, anti-F et anti-H.

Le tableau III représente les résultats des examens comparatifs de nos sérums avec ceux qui nous ont été envoyés.

TABLEAU III.

Sérums	ANDERSON		COHEN		
	anti -A +	anti B +	anti A	anti B	anti H
anti A + 377	22	—	22	—	—
anti B + 383	—	28	—	28	—
anti A + 382	22	—	22	—	—
anti AC + 382	24	—	—	—	—

Il en résulte que nos sérums réagissent de la même manière que les sérums anti-A et anti-B d'Anderson et les sérums anti-A et anti-F de Cohen. Aucun des échantillons de sang que nous avons examinés n'a été agglutiné par le sérum anti-H. De plus, le sérum 382 a agglutiné un certain nombre d'échantillons de globules rouges qui n'étaient agglutinés par aucun de ces sérums.

En vue d'établir la fréquence des différents antigènes chez le lapin, nous avons déterminé les groupes sanguins de 250 lapins

appartenant à des souches et races variées, et obtenu les résultats suivants :

Répartition des groupes sanguins : A, 16 p. 100 ; B, 36 p. 100 ; AB, 39,2 p. 100 ; O, 8,8 p. 100.

Fréquence du facteur A 0,552.

Fréquence du facteur B 0,752.

PHÉNOTYPES	OBSERVÉS	CALCULÉS	$\chi^2$
A . . . . .	40	34	1,06
B . . . . .	90	84	0,43
AB. . . . .	98	104	0,35
O . . . . .	22	28	1,23
			3,12
			3,42 (*)

(\*) Dans nos calculs nous n'avons pas tenu compte de la fréquence du troisième antigène, désigné par le symbole C. Nous n'avons pas obtenu une quantité suffisante de sérum avec anticorps anti-C dont nous aurions eu besoin pour examiner une plus grande quantité de lapins. Sur 42 lapins de cette série nous en avons trouvé trois dont les globules étaient agglutinés par le sérum 382, sans être agglutinés par les autres sérums.

#### CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS.

Sur 250 échantillons de sérum examinés, nous n'en avons trouvé que 7 présentant des iso-anticorps chez les lapins non immunisés. Ces anticorps « naturels » sont de très faible titre (titre 1/1 pour les érythrocytes normaux et 1/8 pour les érythrocytes trypsinés). Dans 4 cas il s'agissait d'anticorps anti-A et dans 3 cas d'anticorps inclassables (d'après notre nomenclature).

Les anticorps obtenus par iso-immunisation se présentèrent tantôt comme des anticorps agglutinants complets, tantôt comme des anticorps incomplets.

Fréquemment ces deux anticorps sont apparus simultanément. Dans un seul cas (385) le lapin immunisé n'a produit dès le début que des anticorps incomplets, décelés, soit par la réaction indirecte de Coombs, soit en utilisant des érythrocytes trypsinés. Dans deux cas (373 et 376), nous avons constaté, en renouvelant les immunisations, au lieu d'une augmentation des titres des anticorps agglutinants, la disparition complète de ceux-ci ; par contre, dans le sérum de ces lapins, le titre des anticorps incomplets atteint 1/4000.

#### RECHERCHE DES ANTIGÈNES DANS LE PLASMA ET LES TISSUS.

L'antigène soluble peut être mis en évidence au moyen de la neutralisation des agglutinines des sérums par les liquides organiques et les extraits de tissus. Pour examiner ce facteur, nous avons ajouté à un volume de sérum de lapin, contenant des iso-agglutinines immunes anti-A (377) ou anti-B (383) un volume



égal de sérum d'un lapin de groupe connu. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire, l'activité agglutinante du sérum a été examinée. Comme témoin, nous avons utilisé le sérum auquel on a ajouté de l'eau physiologique à la place du sérum à examiner. Dans les deux cas, le titre d'agglutination avant et après l'incubation est resté le même. De la même façon nous avons examiné le sérum 382 avec le broyat de la rate d'un lapin du groupe AB. Après incubation (une heure à la température du laboratoire) et centrifugation, nous n'avons constaté aucune inhibition de l'agglutination. Ceci prouve que les antigènes A et B des lapins examinés ne se trouvaient sous forme soluble, ni dans le sérum ni dans les tissus étudiés.

#### RAPPORT ENTRE LES ANTIGÈNES DE GROUPES ÉRYTHROCYTAIRES DE L'HOMME ET DU LAPIN.

Pour déterminer l'existence d'une telle communauté nous avons effectué les expériences suivantes :

Le sérum des lapins contenant des anticorps connus anti-A et anti-B (382 et 383) a été absorbé par les érythrocytes humains A et B. Après la première absorption, les hétéro-agglutinines ont disparu tandis que le titre des iso-anticorps agglutinants vis-à-vis des érythrocytes des lapins correspondants n'a pas varié. Il en résulte qu'il n'y a pas de communauté entre les iso-antigènes érythrocytaires A et B de l'homme et A et B du lapin.

Par contre, il nous a été possible d'absorber les iso-agglutinines anti-B dans le sérum humain par les érythrocytes de lapin. Ceci confirme les observations faites antérieurement par d'autres auteurs (von Dungern et Hirsfeld [16], Boyd et Feldman [6], Fischer [18]), au sujet de la similitude de l'antigène humain B et des antigènes érythrocytaires du lapin. Les érythrocytes des 20 lapins examinés ont absorbé les iso-agglutinines anti-B des sérums humains. Après cette absorption il reste encore dans le sérum humain une certaine quantité d'anticorps anti-B en solution. Ces anticorps ne disparaissent pas complètement, même après plusieurs absorptions.

#### IMPORTANCE DES GROUPES SANGUINS DU LAPIN POUR LA PATHOLOGIE DE LA GESTATION ET POUR LA TRANSFUSION.

Il résulte de l'analyse des iso-anticorps immuns du lapin qu'il existe une grande analogie entre ceux-ci et les anticorps Rh. Il est ainsi possible de reproduire les résultats de l'iso-immunisation, comme l'ont démontré certains auteurs (Dahr [14], Anderson [4], Castle et Keeler [7], Kellner [28]. Dans certains cas, l'iso-immunisation a donné lieu à des symptômes pathologiques

(Nachtsheim et Klein [31], Kellner et Hedal [28], Dahr [14], Anderson [4], Ivanyi [23 bis]); dans d'autres cas, ces symptômes n'étaient pas apparents, en dépit de la sensibilisation des érythrocytes *in vivo* des nouveau-nés (Castle et Keeler [7], Heard [22]).

Nous avons décidé de déterminer dans quelle mesure les symptômes de maladie dépendent du genre des anticorps et du degré d'activité de ceux-ci. Cinq femelles de différents groupes ont été fécondées par des mâles appartenant à des groupes incompatibles; 4 de ces femelles avaient été immunisées auparavant; cette immunisation a été continuée, pour trois d'entre elles, pendant la gestation. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

Femelle N <sup>o</sup> et groupe	Mâle groupe	Immun. pendant la gest.	Anticorps		Nouveau-nés	
			avant	pendant	vivants	morts
375 A	B	—	—	—	7	—
377 B	A	—	1/8	1/2	6	—
373 A	B	+	1/64	1/64	3	3
385 B	A	+	1/512	1/64	—	6
482 B	O	+	1/1	1/1	7	—

Les femelles, dont le sérum présentait un titre assez élevé d'anticorps, immunisées ou non immunisées avant la gestation, ont donc, en dépit de l'incompatibilité de groupe, mis au monde des nouveau-nés sains; celles immunisées pendant la gestation ont mis au monde des portées dont, suivant les cas, tous les membres sont morts ou seulement quelques-uns. La réaction directe de Coombs était positive sur les érythrocytes des 3 nouveau-nés mis au monde par la femelle 373; ils sont morts le lendemain de leur naissance. Quant à la femelle 482, malgré une immunisation opérée pendant la gestation, le titre de l'anticorps anti-O, même vis-à-vis des érythrocytes trypsinés, n'a pas augmenté. Il n'y a pas eu non plus de sensibilisation *in vivo* des érythrocytes des nouveau-nés.

#### DISCUSSION.

Ainsi qu'il résulte des travaux de plusieurs auteurs et de nos propres observations, les érythrocytes de lapin présentent une structure assez complexe. Il ne sera possible de déterminer de façon définitive le nombre des antigènes découverts qu'après avoir confronté les sérums obtenus par les différents auteurs et mis au point une nomenclature uniforme. C'est le but que se sont proposé Joysey [25] et Cohen [10]); ce dernier a examiné quelques-uns des sérums obtenus antérieurement et a démontré

qu'en dépit des différences de nomenclature la plupart des auteurs ont utilisé le même système.

L'adoption d'une nomenclature uniforme devient d'autant plus pressante que les lapins possèdent d'excellentes aptitudes pour la reproduction de syndromes causés par l'iso-immunisation chez l'homme.

Les recherches sur l'érythroblastose fœtale, provoquée par une incompatibilité de groupes sanguins, montrent que les anticorps passent *in utero* en provoquant une maladie du fœtus. Ces anticorps se comportent comme les anticorps anti-Rh ; ils donnent une réaction de Coombs positive et présentent parfois un phénomène de zone ; ils réagissent de la même façon que les anticorps anti-Rh avec les globules rouges papainés ou trypsinés.

Dahr a constaté les symptômes d'érythroblastose du nouveau-né, causée par l'iso-immunisation maternelle. Il a aussi reproduit chez le lapin les symptômes typiques d'un choc post-transfusionnel provoqué par une incompatibilité de groupes sanguins entre le receveur et le donneur. De même Wright a utilisé le lapin pour étudier la survie des érythrocytes transfusés aux lapins des différents groupes. Tout récemment, Anderson a fourni une description très détaillée des stigmates cliniques, sérologiques et hématologiques de l'iso-immunisation pendant la gestation [4].

On n'a pu établir avec certitude si, dans les cas décrits, ces auteurs se sont trouvés en présence des mêmes anticorps ou d'anticorps différents. Les anticorps G et g et anti-A et anti-B (Anderson) passent *in utero*, mais nous ignorons encore si c'est aussi le cas des autres anticorps (anti-H, anti-D, anti-F, etc.). Selon notre expérience, il semble très difficile de provoquer une iso-immunisation par les antigènes C et O.

Fischer a montré que  $K_1$  et  $K_2$  ne se trouvent que dans les érythrocytes, tandis que  $K_3$  et  $K_5$  se trouvent dans les organes. Cela peut entraîner certaines conséquences pour les processus de défense du fœtus contre l'iso-immunisation *in vivo*. Ces observations auraient besoin d'être complétées.

Il en est de même de la communauté des antigènes de l'homme et de ceux du lapin. D'après nos propres expériences, une telle communauté n'est pas apparente ; néanmoins nous avons pu confirmer les observations d'autres auteurs quant à la présence dans les érythrocytes du lapin d'un facteur absorbant les agglutinines anti-B du sérum humain.

Fischer a obtenu un sérum agglutinant les globules rouges de certains lapins, en immunisant les lapins avec les érythrocytes humains. Une relation semble donc exister entre les antigènes humains B et les antigènes des globules rouges du lapin. D'autres travaux ont cependant permis à Fischer d'aboutir à la

conclusion que l'existence d'une structure « B » ou « A » dans l'organisme du lapin ne correspond pas aux antigènes spécifiques des érythrocytes des lapins.

Friedenreich [20] et Owen [32] expliquent ce fait par la complexité des agglutinines anti-B, c'est-à-dire anti-B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>. Récemment, les études physico-chimiques de Jacquot-Armand et Filitti-Wurmser [24] ont montré que la quantité d'anti-B qui se fixe sur les hématies du lapin paraît dépendre du rapport entre anti-B et anti-lapin. Selon l'expérience de ces auteurs, les divers sérums humains sont susceptibles de contenir des quantités variables d'agglutinines anti-lapin ou d'un facteur hypothétique qui aide à la fixation de l'anti-B.

Nous avons pu montrer que le sérum anti-B, après absorption par les globules humains B, conservait le titre des hétéro-agglutinines anti-lapin.

Un des problèmes au sujet duquel les opinions varient encore est celui des iso-agglutinines naturelles chez le lapin. En dépit d'une grande diversité antigénique et de l'absence du facteur soluble dans les fluides et les tissus, les iso-agglutinines « naturelles » n'ont pu être trouvées que dans des cas exceptionnels. Dans nos expériences, sur 250 lapins non immunisés, nous n'avons trouvé que 7 lapins avec des iso-agglutinines. On pourrait supposer que ces iso-agglutinines ont été provoquées par la gestation, car il s'agissait exclusivement de femelles. Mais, de même qu'Anderson, nous avons pu constater que les grossesses successives, sans immunisation artificielle, ne provoquent pas l'apparition des anticorps (2).

#### RÉSUMÉ.

Après un court aperçu de l'état actuel des recherches sur les groupes sanguins chez le lapin, les auteurs communiquent les résultats de leurs propres expériences, qui ont abouti à l'individualisation de quatre antigènes érythrocytaires chez les lapins examinés. Ces antigènes ne se trouvent ni dans le plasma, ni dans les extraits de tissus. Aucune communauté n'existe entre ces antigènes érythrocytaires du lapin et ceux de l'homme.

Au moyen de l'iso-immunisation pendant la gestation il a été

(2) L'un de nous (M<sup>me</sup> L.-S.) remercie M. Dujarric de la Rivière de l'avoir autorisée à poursuivre ses travaux dans les laboratoires de l'Institut Pasteur.

Nous remercions M<sup>me</sup> Podliachouk d'avoir eu l'amabilité d'effectuer les contrôles statistiques.

Nous sommes reconnaissants à MM. Anderson et Cohen d'avoir eu l'obligeance de mettre des échantillons de leurs sérums de référence à notre disposition et à M. Cohen d'avoir examiné l'action de nos anti-sérums sur les globules rouges de ses animaux de référence.

possible de provoquer une érythroblastose fœtale ; ceci constitue une preuve de l'existence d'une grande analogie entre les iso-anticorps immuns de lapin et les anticorps humains anti-Rh.

## SUMMARY

### THE BLOOD GROUPS IN RABBITS.

After a summary of present achievements in the field of research concerning rabbit blood groups, the authors review the results of their own experiments.

Four antigens of the red cells have been found in the rabbits examined. Neither in plasma nor in tissue extracts have these antigens been found. There is no community between rabbit and human antigens of the red cells.

By applying iso-immunization during pregnancy, it was possible to bring about erythroblastosis fœtalis ; this constitutes a proof of the existence of marked analogy between immune rabbit iso-antibodies and Rh antibodies.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDERSON (J. R.). *Brit. J. Haematol.*, 1955, **1**, 378.
- [2] ANDERSON (J. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1955, **36**, 137.
- [3] ANDERSON (J. R.). *Brit. J. Haematol.*, 1956, **2**, 44.
- [4] ANDERSON (J. R.). *Pathol. et Biol.*, 1958, **6**, VII-VIII.
- [5] BESSIS (M.) et FREIXA (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 27.
- [6] BOYD (W. C.) et FELDMAN (D.). *J. Immunol.*, 1934, **27**, 547.
- [7] CASTLE (W. E.) et KEELER (G. E.). *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, 1933, **19**, 92.
- [8] COHEN (C.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 432.
- [9] COHEN (C.). *Science*, 1956, **123**, 935.
- [10] COHEN (C.). *Transplantation Bull.*, 1958, **5**, 27.
- [11] DAHR (P.) et KNUEPPEL (H.). *Klin. Wschr.*, 1947, **25**, 592.
- [12] DAHR (P.) et FISCHER (K.). *Z. Hyg.*, 1954, **139**, 268.
- [13] DAHR (P.), FISCHER (K.) et KINDLER (M.). *Z. Hyg.*, 1955, **141**, 91.
- [14] DAHR (P.) et FISCHER (K.). *Bibliothec Haematol.*, 1956, **5**, 156.
- [15] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et EYQUEM (A.). *Les groupes sanguins chez les animaux*. Flammarion, édit., Paris, 1953.
- [15 bis] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSOVITCH (N.). Baillière et fils, édit., 1936.
- [16] DUNGERN (E. von) et HIRSZFELD (L.). *Z. Immunitätsf.*, 1911, **8**, 526.
- [17] EYQUEM (A.). *Vox sanguinis*, 1952, **5**, 247.
- [18] FISCHER (W.). *Z. Immunitätsf.*, 1935, **86**, 97.
- [19] FISCHER (K.) et KINDLER (M.). *Z. Hyg.*, 1955, **141**, 122.
- [20] FRIEDENREICH (V.) et WITH (S.). *Z. Immunitätsf.*, 1933, **78**, 152.
- [21] FREUND (J.) et MC DERMOTT (K.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1942, **78**, 152.



- [22] HEARD (D. H.), HINDE (J. T.) et MYNORS (L. S.). *J. Hyg.*, 1949, **47**, 119.
  - [23] HELMBOLD (W.). *Blut*, 1956, **2**, 9.
  - [23 bis] IVANYI (P.) et TOMASKOVA (M.). *Ceskoslovenska Biol.*, 1955, **4**, 613 et 1956, **5**, 309.
  - [24] JACQUOT-ARMAND (Y.), THEOLEYRE (M.) et FILITTI-WURMSER (S.). *Rev. Hématol.*, 1956, **11**, 1.
  - [25] JOYSEY (V. C.). *J. exp. Biol.*, 1955, **32**, 440.
  - [26] KEELER (C. E.) et CASTLE (W. E.). *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, 1933, **19**, 403.
  - [27] KELLNER (A.) et HEDAL (E. F.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 33.
  - [28] KELLNER (A.) et HEDAL (E. F.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 51.
  - [29] KNOPFMACHER (H. P.). *J. Immunol.*, 1942, **44**, 121.
  - [30] LEVINE (P.) et LANDSTEINER (K.). *J. Immunol.*, 1929, **17**, 559.
  - [30 bis] MATSUMOTO (K.) et WATANABE (Y.). *Memoirs Facul. Agricult. Hokkaido University*, 1954, **2**, 162.
  - [31] NACHTSHEIM (H.) et KLEIN (H.). *Ab. Dtsch. Akad. Wissensch.*, 1947, 5.
  - [32] OWEN (R. D.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 29.
  - [33] WRIGHT (C. S.), DODD (M. C.), BOURONCLE (B. A.) et BUNNIER (A. E.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 81.
-

# COMPOSITION ANTIGÉNIQUE DES TRÉPONÈMES

## I. L'ANTIGÈNE PROTÉIQUE DE GROUPE DE LA SOUCHE REITER

par J. PILLOT et M. FAURE (\*).

(Institut Pasteur)

Les tréponèmes, comme les autres micro-organismes, renferment plusieurs antigènes. Certains de ces antigènes ont pu être individualisés en les séparant des corps microbiens par des méthodes chimiques, d'autres n'ont pu être révélés que par des techniques immunologiques.

Les études chimiques ont porté presque uniquement sur les tréponèmes non pathogènes, en particulier la souche Reiter, que l'on peut cultiver aisément. On en a séparé des préparations antigéniques de nature lipidique, de nature protéique et de nature polysidique, mais ces préparations sont loin d'être constituées par des produits purs, du point de vue chimique, ni du point de vue immunologique. Il nous a paru intéressant de reprendre certaines de ces études afin de mieux préciser la structure antigénique des tréponèmes (1).

### L'ANTIGÈNE PROTÉIQUE DE GROUPE.

On avait remarqué depuis longtemps (Noguchi, 1912 ; Gaethgens, 1929) qu'il existait une parenté antigénique entre *Treponema pallidum*, agent de la syphilis, et des tréponèmes non pathogènes, la souche Reiter en particulier : les suspensions de ces tréponèmes non pathogènes sont susceptibles de fixer le complément en présence de sérum de sujet syphilitique. On retrouve cette communauté antigénique dans les produits protéiques extraits du tréponème Reiter. D'Alessandro et ses collaborateurs [3] ont obtenu une préparation sérologiquement active constituée par une solution opalescente diluée (0,5 p. 1 000) de protéines précipitables par le sulfate d'ammonium et coagulables par la chaleur.

(\*) Manuscrit reçu le 14 octobre 1958.

(1) Cette question a fait l'objet récemment de plusieurs revues bibliographiques détaillées, nous avons donc jugé inutile de l'exposer à nouveau. Nous renvoyons le lecteur à ces publications et en particulier à [1] et [2].

Ils ont dénommé leur produit A. T. P. S. : antigène tréponémique protéique soluble. L'hydrolyse de l'A. T. P. S. libère de nombreux acides aminés et 10 p. 100 environ d'oses. Une partie de l'antigène se trouve sous une forme macromoléculaire, qui sédimente par ultracentrifugation à 20 000 *g*. L'analyse électrophorétique sur papier de la solution révèle la présence de deux substances. Cet antigène fixe le complément non seulement en présence de sérum anti-tréponèmes Reiter, mais encore en présence de sérum de sujet syphilitique. Cette fixation est due à un système antigène-anticorps différent du couple antigène lipidique de Wassermann-réagine syphilitique.

Dans ce travail, nous avons repris l'étude de cet antigène protéique. Afin de simplifier autant que possible le problème immunologique, nous avons limité nos recherches à l'étude de la réaction croisée, tréponème Reiter-sérum de sujet syphilitique. Ce n'est qu'accessoirement que nous avons comparé les résultats obtenus avec le système hétérologue, avec ceux donnés par le système homologue, tréponème Reiter-sérum anti-Reiter. Nous avons principalement utilisé une réaction de fixation du complément, méthode sérologique très sensible, ne demandant que de petites quantités d'antigène et d'anticorps, à l'inverse de la réaction de précipitation qui exige l'emploi de réactifs beaucoup plus concentrés.

Nous avons cherché à préparer cet antigène avec un bon rendement et à l'obtenir sous une forme réellement soluble afin de pouvoir le purifier. Si on divise des corps tréponémiques par broyage (broyage mécanique, ultra-sons, cryolyse) on augmente leur activité sérologique, mais l'antigène reste en grande partie lié à des particules de composition très complexe. Lorsqu'on applique à ces suspensions, même les plus fines, divers procédés de précipitations fractionnées (sels neutres, solvants organiques, acides...) quelle que soit la méthode employée, on fait flocculer les mêmes particules qui présentent toujours une constitution aussi complexe ; autrement dit, il n'est pas possible de réaliser une purification de la substance antigénique tant qu'elle est liée à d'autres constituants tréponémiques.

Des essais divers nous ont montré que l'antigène protéique de groupe est très fortement lié aux corps tréponémiques, et qu'il est uni à d'autres constituants antigéniques de ce micro-organisme. Ce fait permet de laver ce germe sans perdre d'antigène, et même d'en extraire certains constituants qui ne souilleront pas ultérieurement la solution antigénique.

Nous avons solubilisé l'antigène en milieu alcalin, phénomène qui est favorisé par la délipidation préalable des tréponèmes et par leur broyage. Les opérations doivent être conduites avec précaution, car cet antigène protéique se dénature facilement ;

il perd sa solubilité dans l'eau, alors qu'une partie au moins de son activité sérologique peut être conservée, et demeure alors dans les fractions insolubles. Nous avons purifié ensuite l'antigène par précipitation de sa solution en l'acidifiant à pH 3,5 ; ceci nous a permis de le séparer d'un autre antigène qui paraît spécifique de la souche Reiter : il ne réagit pas avec le sérum de sujet syphilitique, mais seulement avec le sérum homologue anti-Reiter.

L'analyse immuno-chimique par précipitation en milieu gélifié de l'antigène purifié nous a montré qu'il renferme au moins trois substances. Pour pouvoir poursuivre la purification de cet antigène, il sera utile de provoquer la dissociation des édifices macromoléculaires qu'il renferme, et que l'on peut séparer par une ultra-centrifugation à 36 000 *g*.

Des essais sérologiques importants, conduits en France et dans les territoires d'Outre-Mer, nous ont montré que nos préparations sont douées d'excellentes qualités de spécificité et de sensibilité lorsqu'on les emploie pour effectuer le séro-diagnostic de la syphilis ou du pian. Nous nous sommes appliqués à mettre au point une méthode de conservation prolongée de ces antigènes, afin de faciliter leur utilisation pratique ; nous sommes parvenus à un très bon résultat par addition d'un égal volume de glycérine à la solution antigénique tamponnée.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### TECHNIQUE SÉROLOGIQUE.

L'activité antigénique des divers produits obtenus est déterminée à l'aide d'une réaction de fixation du complément exécutée selon la méthode de Kolmer. Les volumes des divers réactifs introduits sont les suivants, exprimés en centimètres cubes : sérum, 0,05 ; antigène, 0,1 ; complément (2 unités), 0,4 ; sérum hémolytique (2 unités), 0,1 ; suspension de globules de mouton à 2 p. 100, 0,1. La fixation du complément est réalisée soit pendant une nuit à 4°, soit pendant une heure à 37°. On emploie comme sérum un mélange de sérum de sujets syphilitiques, afin de déterminer uniquement l'activité antigénique de groupe.

*Le titre* d'une préparation antigénique est donné par la dilution la plus élevée de cet antigène donnant une réaction positive avec la plus petite quantité possible de sérum. *La sensibilité* de l'antigène est donnée par la dilution la plus élevée du sérum donnant une réaction positive en présence de l'antigène utilisé à son titre. Ces grandeurs sont déterminées en exécutant une série de réactions mettant en jeu, d'une part, des dilutions croissantes de 1/2

en 1/2 du sérum et, d'autre part, des dilutions croissantes de 1/2 en 1/2 de l'antigène.

(Sauf spécification, toutes les fois que nous mentionnerons l'activité antigénique de nos préparations, il sera entendu qu'il s'agit de l'activité sérologique révélée *in vitro* par cette réaction de fixation du complément, exécutée avec un sérum de sujet syphilitique et non avec un sérum anti-Reiter.)

#### CULTURE DES TRÉPONÈMES, SOUCHE REITER (2).

Au début de ce travail, nous avons cultivé ces tréponèmes dans du milieu de Brewer Difco ou dans du bouillon « V. F. » additionné de 0,05 p. 100 d'acide thioglycolique. Actuellement, nous réalisons cette culture dans de meilleures conditions, en utilisant un milieu préparé au laboratoire selon une formule analogue à celle de Brewer : digestat pancréatique de caséine, autolysat de levure, glucose, cystéine et acide thioglycolique. Dans tous les cas, on ajoute au milieu 10 p. 100 de sérum de lapin ou de cheval préalablement chauffé à 56°. On filtre une deuxième fois ce sérum juste avant l'emploi, afin d'éliminer le dépôt formé par vieillissement.

Une anaérobiose stricte étant indispensable, on réalise la culture dans des récipients obturés avec des bouchons de caoutchouc. Une légère agitation accélère le développement de la culture dont le maximum est atteint en cinq jours à 37°. On effectue la récolte le sixième jour ; à ce stade, les tréponèmes se présentent sous une forme spiralée, ils sont en voie d'immobilisation et ils présentent des petites granulations caractéristiques d'une très prochaine vésiculation.

#### RÉCOLTE ET LAVAGE DES TRÉPONÈMES.

Les tréponèmes sont recueillis par centrifugation ; on obtient par litre de culture 1,5 g à 2 g de corps humides renfermant 75 p. 100 d'eau et 25 p. 100 de matière sèche.

On lave les tréponèmes quatre fois avec une solution physiologique, afin d'éliminer les éléments provenant du milieu de culture. On utilise pour chaque opération un volume de solution cent fois plus petit que celui de la culture initiale. En fait, ces lavages extraient également certains constituants des tréponèmes et l'on favorise considérablement cette extraction en employant une solution physiologique tamponnée à pH 7,2 (3). Les substances

(2) Cette souche nous a été transmise par le professeur Pautrizel de la Faculté de Médecine de Bordeaux ; nous le remercions vivement.

(3) Chlorure de sodium, 8,5 g ; véronal acide, 0,57 g ; véronal sodique, 0,37 g ; eau Q. s., 1 000 cm<sup>3</sup>.



dissoutes donnent un précipité important par addition d'un égal volume d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Elles ne sont douées, cependant, que d'une activité sérologique négligeable.

Le lavage des tréponèmes avec cette solution tamponnée constitue donc un premier stade de purification de l'antigène de groupe qui ne sera pas souillé, lors de sa dissolution, par les substances inactives précédemment éliminées.

#### SOLUBILISATION DE L'ANTIGÈNE.

L'antigène protéique de groupe est fortement lié aux corps tréponémiques. Pour rompre les liaisons qui l'unissent aux autres constituants cellulaires, on peut faire agir des agents différents : broyage, alcalinisation, délipidation, mais leur choix est limité par la fragilité de la protéine active. Pour obtenir un bon résultat, nous avons été amenés à associer plusieurs de ces agents et à les faire intervenir dans un ordre déterminé.

Les tréponèmes lavés sont mis en suspension dans un volume d'eau physiologique cent fois plus petit que celui de la culture initiale, suspension que l'on homogénéise soigneusement par agitation mécanique en présence de billes de verre. Après action de l'agent utilisé, on observe, à l'aide d'un microscope à contraste de phase, les modifications de la morphologie des tréponèmes ; ensuite, on titre l'activité antigénique du produit obtenu : activité d'une part de la suspension totale, d'autre part des produits solubles séparés par une centrifugation d'une heure à 10 000 *g*. Les résultats obtenus dans les essais suivants sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I. — **Activité antigénique des tréponèmes lavés à pH 7,2, mis en suspension dans un volume cent fois plus petit que celui de la culture et soumis à des traitements divers. Le volume de toutes les préparations est ajusté à celui de la suspension initiale. Les chiffres inscrits expriment le titre antigénique : inverse de la dilution de la préparation donnant une réaction de fixation du complément positive avec la plus petite quantité possible de sérum de sujet syphilitique.**

TRAITEMENT	SUSPENSION TOTALE	FRACTION SOLUBLE
Suspension initiale .....	100	1
Cryolyse .....	100-150	0-25
Broyage mécanique .....	100-200	25
Ultra-sons (U. S.) .....	200-400	50
pH 8,5-9 .....	100	25
pH 8,5-9 + U. S. ....	200-400	50-100
Délipidé butanol-éther .....	100	25
Délipidé + pH 8,5-9 .....	100	25-50
Délipidé + pH 8,5-9 + U. S. ....	200-400	150-200

a) *Action du broyage.* — Nous avons étudié les résultats donnés par la désintégration des corps tréponémiques comparativement par des broyages mécaniques, par cryolyse et sous l'action des ultra-sons.

La cryolyse est réalisée par des congélations à  $-15^{\circ}$  suivies de décongélations lentes. Ces opérations répétées jusqu'à quatorze fois altèrent peu la morphologie des tréponèmes dont la structure spiralée reste parfaitement visible. La suspension obtenue possède un pouvoir antigénique un peu supérieur à celui de la suspension initiale, et la fraction soluble une activité sérologique très faible.

Le broyage mécanique est effectué dans un appareil de Danguoumeau : récipient en acier inoxydable garni de billes d'acier de tailles variées et animé d'un mouvement de va et vient rapide : déplacement de 4 cm à la cadence de 700 coups par minute. L'enceinte est maintenue à une température de  $15^{\circ}$  par une circulation d'eau. Après trente minutes de fonctionnement, on observe une dispersion des corps tréponémiques dont la morphologie est peu altérée. La suspension possède une activité antigénique supérieure à celle de la suspension initiale, activité dont  $1/4$  à  $1/8$  se trouve sous une forme soluble.

L'action des ultra-sons (4) a été étudiée à l'aide d'un appareil qui émet un flux d'une fréquence de 960 KHz avec une puissance de 150 W sur une surface vibrante de  $11\text{ cm}^2$ . Une circulation d'eau permet de maintenir la température en dessous de  $15^{\circ}$  pendant l'opération, que l'on réalise dans une atmosphère d'hydrogène afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Comparée aux moyens de broyage précédents, l'ultrasonation s'avère de loin la méthode la plus efficace. Très rapidement, on obtient un hachage très poussé des corps microbiens. Au microscope, on observe une suspension homogène de particules douées de réfringences différentes et animées de mouvement brownien ; les éléments spiralés ont complètement disparu. L'activité antigénique est de deux à quatre fois plus élevée que celle de la suspension initiale, et  $1/4$  à  $1/8$  de cet antigène est sous une forme soluble. Le temps d'ultrasonation nécessaire pour obtenir ces résultats est fonction du volume de la suspension traitée et de sa viscosité. Pour des volumes de 10 à  $50\text{ cm}^3$  de tréponèmes mis en suspension dans un volume cent fois plus petit que celui de la culture initiale, il est utile de prolonger l'opération pendant trente minutes. Des temps plus brefs donnent des suspensions très actives sérologiquement, mais dans lesquelles une proportion moindre de l'antigène est sous une forme soluble.

(4) L'expérimentation portant sur l'action des ultrasons a été poursuivie en collaboration avec M. Prud'homme ; nous le remercions de l'aide qu'il nous a apportée et de ses conseils éclairés.

L'action d'ultra-sons à des fréquences de 19 KHz et de 10 KHz « magnéto striction » donne des résultats analogues.

b) *Action de l'alcalinité.* — A un pH supérieur à 12, on obtient une lyse totale des tréponèmes, mais l'activité sérologique de l'antigène protéique de groupe est totalement détruite. Cette altération en milieu alcalin n'apparaît qu'avec des pH supérieurs à 10, et les réactions légèrement moins alcalines sont particulièrement propres au passage en solution des protéines qui gardent intactes leurs propriétés antigéniques. Le pH optimum d'extraction est situé entre 8,5 et 9. A pH 7,2-7,4 il se produit une solubilisation importante de composés qui paraissent être de nature protéique (précipitation avec de l'acide trichloracétique) et qui sont pratiquement dénués d'activité sérologique, comme nous l'avons exposé plus haut. Cette propriété est mise à profit pour laver les tréponèmes avant d'en extraire l'antigène de groupe.

Si on associe les actions d'un milieu alcalin et d'un broyage, on parvient à solubiliser une proportion plus importante de l'antigène. Des tréponèmes lavés préalablement à pH 7,2, mis en suspension dans une solution de véronal tamponnée à pH 8,5, puis soumis à l'action des ultra-sons pendant trente minutes, donnent une préparation antigénique très active dont on peut séparer une solution de protéines renfermant 25 p. 100 environ de l'activité sérologique.

c) *Effet de la délipidation.* — La délipidation, en éliminant des corps microbiens les composés lipidiques peu solubles dans l'eau, facilite la solubilisation des autres substances. Cette délipidation a également pour effet de rompre un certain nombre de liaisons qui unissent les divers constituants cellulaires, et de libérer ainsi des produits inclus dans les particules cytoplasmiques. Cette propriété a été mise à profit par Morton [4] qui, en délipidant à l'aide de butanol des matériaux biologiques des plus variés, a pu obtenir sous une forme soluble des enzymes liés aux particules cellulaires insolubles. On obtient des résultats analogues avec les tréponèmes : la méthode de Morton et d'autres procédés de délipidation, permettant de ne pas dénaturer les protéines, provoquent la libération de nombreuses substances solubles, libération qui se traduit par une élévation considérable de la pression osmotique de la préparation et par la solubilisation de l'antigène de groupe. La délipidation par l'alcool-éther à basse température, méthode de Mac Farlane employée pour le plasma sanguin, ne donne que de médiocres résultats même si l'on maintient la température rigoureusement au-dessous de  $-5^{\circ}$  ; toute élévation de température, même passagère, diminue la solubilité de l'antigène et altère considérablement son activité sérologique.

Nous préférons la méthode de Morton d'exécution plus facile et qui permet une élimination plus totale des lipides ; 90 à 95 p. 100 des lipides totaux, dosés par la méthode de Kumagawa, sont extraits par cette technique. La suspension de tréponèmes est agitée à une température de  $+4^{\circ}$  avec du butanol saturé d'eau. Les lipides dissouts dans la phase butylique sont séparés. Pour éliminer le butanol qui sature la phase aqueuse, plusieurs procédés peuvent être employés : la dialyse, ou l'extraction avec de l'éther ou de l'éther de pétrole. On peut également séparer l'antigène par précipitation avec de l'acétone, mais il est difficile de ne pas l'altérer même si l'on opère à une température inférieure à  $0^{\circ}$ . La dialyse est longue, elle exige le renouvellement fréquent de l'eau, et comme le produit délipidé possède une pression osmotique élevée, on obtient finalement une solution antigénique très diluée. Des extractions répétées avec de l'éther de pétrole, ou mieux avec de l'éther sulfurique, présentent l'avantage de parachever la délipidation. L'éther est ensuite chassé à l'aide d'un jet d'air projeté sur la solution. Si après la délipidation des tréponèmes, on fait intervenir l'action solubilisante de l'alcalinité et celle des ultra-sons, on obtient une solution très riche en antigène, qui a une activité sérologique égale à la moitié de celle de la suspension totale, et qui est nettement plus élevée que celle de la suspension initiale des tréponèmes (tableau I). Dans le paragraphe suivant, nous donnons le détail des manipulations. Pour obtenir un bon résultat, il faut respecter l'ordre d'exécution ci-dessus des diverses opérations. Pour des raisons que nous n'avons pas encore élucidées, si l'on soumet les tréponèmes à l'action des ultra-sons avant de les délipider, on ne solubilise qu'une partie infime de l'antigène à pH 9.

#### PURIFICATION DE LA SOLUTION ANTIGÉNIQUE.

Pour purifier l'antigène contenu dans la solution obtenue, nous avons fait appel à divers agents de précipitation des protéines : sels neutres, solvants organiques, acides. Avec le sulfate d'ammonium, il faut amener la concentration saline de la solution aux  $2/3$  de la saturation pour obtenir la précipitation de la totalité de l'activité antigénique. Avec l'alcool ou l'acétone, il est nécessaire d'introduire un volume de solvant égal à celui de la solution pour provoquer la précipitation de l'antigène, mais celui-ci est en partie dénaturé, même si l'on opère à  $0^{\circ}$  : le précipité ne possède plus qu'une activité antigénique réduite. Par contre, les acides précipitent très aisément l'antigène sans l'altérer si l'on opère à  $+4^{\circ}$  et si l'on n'abaisse pas le pH à une valeur inférieure à 3. Lorsqu'on acidifie progressivement la solution, un précipité apparaît à pH 4,5 puis il augmente d'importance lorsque le pH s'abaisse. A pH 3,5 la totalité de l'antigène est insolubilisée, on le recueille par centrifugation et on le redissout dans



une solution saline tamponnée neutre. La précipitation de l'antigène est obtenue quel que soit l'acide employé, acide acétique, acide trichloracétique..., elle dépend seulement du pH de la solution. Dans la solution mère de précipitation de l'antigène, il reste une quantité importante de substances : un tiers des produits initialement dissous. Ces substances, qui sont dépourvues d'activité antigénique en présence de sérum de sujets syphilitiques, sont susceptibles de réagir avec un sérum de lapin anti-tréponèmes Reiter. Par ce procédé, on purifie donc l'antigène de groupe dont on sépare un autre antigène spécifique de la souche Reiter ; nous poursuivons l'étude de ce dernier produit.

#### TECHNIQUE DE PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE.

Les études précédentes nous ont permis de mettre au point une méthode de préparation de l'antigène que l'on peut obtenir régulièrement et avec un bon rendement.

Toutes les opérations, à l'exception de l'ultrasonation, sont réalisées dans une chambre froide à  $+4^{\circ}$ . On veille à ce que les séjours en milieu alcalin, pH 9, ou en milieu acide, pH 3,5, soient aussi brefs que possible. On utilise de l'alcool butylique distillé en présence de potasse, et de l'éther fraîchement rectifié en présence de chlorure stanneux destiné à détruire le peroxyde d'éthyle.

Les tréponèmes, lavés quatre fois avec la solution physiologique tamponnée à pH 7,2, sont placés dans un tube à centrifuger que l'on peut obturer avec un bouchon de verre rodé. On les met en suspension dans un volume de solution cent fois plus petit que celui de la culture initiale ; on emploie une solution fortement tamponnée à pH 7,4 avec du véronal (5). La suspension tréponémique est agitée vigoureusement avec 2 volumes de butanol saturé d'eau. Il se forme une émulsion qui se brise partiellement. On laisse en contact pendant deux heures en agitant de temps en temps. On centrifuge. Les tréponèmes se placent à l'interface eau-butanol. On élimine le butanol en le décantant par aspiration. On ajoute à nouveau deux volumes de butanol saturé d'eau, on agite et on décante le butanol. La phase aqueuse est agitée avec quatre volumes d'éther qu'on élimine par aspiration après centrifugation. Les extractions éthérées sont répétées quatre fois au total. Les solvants organiques entraînent une petite quantité de l'acide diéthyl-barbiturique et la phase aqueuse s'alcalinise ; le pH passe de 7,4 à un chiffre voisin de 8. On transvase la phase aqueuse dans une fiole à vide conique de façon à ce qu'elle occupe une grande surface sur une faible épaisseur. L'éther est éliminé par un courant d'air projeté à la surface du liquide et entraîné par une légère dépression. On évite soigneusement qu'il se produise des projections sur les parois du récipient ; la dessiccation altère l'antigène qui devient insoluble et perd son activité.

Après la disparition de toute odeur d'éther (douze à vingt heures), on alcalinise le produit avec de la soude normale jusqu'à pH 8,8 à 9

(5) Chlorure de sodium, 8,5 g ; véronal acide, 4,60 g ; véronal sodique, 3,0 g ; eau Q. s., 1 000 cm<sup>3</sup>.



(virage net et persistant au rose d'une goutte de solution de phénol-phtaléine introduite dans la préparation). On transvase la préparation dans l'éprouvette spéciale possédant un fond de cellophane perméable aux ultrasons. On fait barboter un courant d'hydrogène dans l'éprouvette pendant une à deux minutes, puis on ferme rapidement le récipient. On soumet le produit au flux d'ultra-sons (960 KHz, 150 W) pendant trente minutes en veillant à ce que la température ne s'élève pas au-dessus de 15°.

L'ultrasonnat est centrifugé pendant une heure à 10 000 *g* et la solution est décantée. Le culot de centrifugation est lavé deux fois avec de petites quantités d'eau physiologique (1/4 du volume de la solution précédente). On réunit les solutions que l'on ramène à la neutralité par addition d'acide chlorhydrique.

On acidifie la solution à pH 3,5 par addition d'acide acétique à 20 p. 100 (virage au bleu pâle d'une goutte de bleu de bromophénol introduite dans la préparation). Le précipité est séparé par centrifugation, on le lave deux fois avec de l'eau physiologique acidifiée à pH 3,5. On le dissout dans la solution de véronal fortement tamponnée à pH 7,4 et on ajuste le volume de cette solution à celui de la suspension initiale des tréponèmes (6).

L'activité antigénique de la préparation purifiée est supérieure à celle de la suspension initiale des tréponèmes. Dans le tableau II, nous donnons le poids des produits obtenus au cours des étapes successives de la préparation. On constate que l'activité antigénique de l'antigène purifié est contenue dans un poids de substances cinq, six fois plus petit que celui des tréponèmes dont il a été extrait.

TABLEAU II. — Poids secs exprimés en milligrammes des préparations obtenues à partir de 1 l de culture de tréponèmes.

Tréponèmes récoltés .....	350
Tréponèmes lavés (*) .....	236
Lipides .....	25
Extrait antigénique soluble (*) .....	102
Antigène purifié (*) .....	62
Solution-mère de purification (*) .....	30

(\*) Poids déterminés après une dialyse prolongée d'une partie aliquote des préparations dans de l'eau distillée.

#### PROPRIÉTÉS DE L'ANTIGÈNE PURIFIÉ.

La solution de l'antigène purifié renferme 6 mg environ de substances sèches par centimètre cube. Elle est très légèrement opalescente.

L'ultracentrifugation de la solution (7) montre que l'antigène

(6) On peut limiter sans difficulté le volume de cette solution à la moitié de celui de la suspension initiale et même à un volume moindre.

(7) Nous remercions P. Slizewicz, qui a réalisé pour nous ces ultracentrifugations.

est sous une forme polydispersée : après une centrifugation d'une heure à 20 000 *g*, il se dépose un sédiment qui entraîne les 3/4 de l'activité antigénique ; mais après une deuxième centrifugation à 36 000 *g*, une petite partie de l'activité demeure dans le liquide surnageant. Lorsqu'on soumet la solution de l'antigène à une nouvelle ultrasonation avec des fréquences de 950 KHz ou de 17 KHz, le degré de dispersion de l'antigène n'est pas modifié. Nous avons tenté de scinder les particules sédimentables par des digestions enzymatiques ménagées ; mais, jusqu'à présent, nous ne sommes pas parvenus à les dégrader sans altérer profondément leur activité antigénique.

Par ultrafiltration, on arrête la totalité des substances antigéniques avec une membrane possédant des pores de 250 à 400 m $\mu$ .

Lorsqu'on chauffe la solution de l'antigène pendant une heure à 100°, l'activité sérologique est totalement détruite. Cependant, les protéines ne sont coagulées que si la solution renferme des sels et possède un pH inférieur à 7 ; dans l'eau distillée ou en milieu légèrement alcalin (pH 7,2-7,4), on n'observe aucune insolubilisation. Après congélation à -15° et décongélation de la solution, une partie importante de l'antigène s'insolubilise.

Après une dialyse prolongée de la solution vis-à-vis d'eau distillée, l'antigène demeure en solution. Comme nous l'avons vu précédemment, l'antigène précipite de sa solution sous l'action du sulfate d'ammonium (2/3 de la saturation) et par acidification à pH 3,5.

L'antigène purifié renferme de l'azote 12 p. 100 et du phosphore 1,96 p. 100. Ces chiffres montrent que cette préparation n'est pas constituée uniquement par des protéines.

TABLEAU III. — Analyse des préparations obtenues.

	N p. 100	P p. 100
Extrait antigénique soluble .....	11,8	2,2
Antigène purifié .....	12	1,96
Solution-mère de purification .....	11	2,68

#### ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ANTIGÈNE PURIFIÉ.

L'antigène purifié fixe le complément en présence de sérum d'homme ou de lapin syphilitiques. Le maximum de sensibilité est obtenu lorsque la solution préparée à l'aide de la technique décrite plus haut est diluée à 1/100-1/150 (titre de l'antigène). La solution ainsi diluée renferme 60 à 40  $\mu$ g de substances sèches par centimètre cube. Cet antigène est dénué de pouvoir anticomplémentaire. Lorsqu'on titre cet antigène, on observe un phénomène

de zone peu marqué : faible inhibition de la réaction par un excès d'antigène. Par contre, si au cours de la préparation l'antigène a subi des dénaturations, ce phénomène de zone devient très important.

Cet antigène fixe également le complément avec du sérum de lapin anti-tréponème Reiter. Dans ce cas, le titre de l'antigène n'est que légèrement supérieur à celui déterminé avec les sérums syphilitiques, ce qui montre que le tréponème de la syphilis renferme un antigène très voisin de celui du tréponème Reiter. Par contre, cet antigène ne fixe pas le complément en présence d'anticorps anti-antigène de Wassermann (sérum de lapin immunisé avec un mélange d'extrait alcoolique de cœur et de sérum de porc).

L'antigène purifié précipite au contact du sérum de lapin anti-tréponème Reiter. Lorsqu'on opère en milieu gélifié (technique de diffusion double), on observe au moins trois zones de précipitation ; on a donc un système immunologique complexe. Ces antigènes étant sous la forme de produits de poids moléculaire élevé, ils diffusent très lentement dans la gélose ; la précipitation apparaît au voisinage de la cuve contenant l'antigène, puis elle se déplace lentement vers la cuve contenant le sérum. C'est dans l'espoir d'obtenir une meilleure analyse immunologique avec des stries plus nettes que nous poursuivons les essais de dégradation enzymatique de l'antigène soluble.

On a vu plus haut (tableau I) comment le traitement de la suspension de tréponèmes par divers agents de désintégration augmentait son titre antigénique. On observe également sous l'action des ultra-sons et des alcalis une augmentation de la sensibilité sérologique : on obtient une réaction positive avec une dilution du sérum syphilitique plus élevée qu'en présence de la suspension initiale. Le phénomène est très net avec les suspensions totales qui peuvent présenter une sensibilité deux fois plus grande que celle de la suspension initiale. Par contre, l'antigène purifié n'est que légèrement plus sensible par rapport à la suspension initiale. Ces observations montrent également que l'on est en présence d'un système antigénique multiple même lorsqu'on examine à l'aide de la réaction de fixation du complément le système hétérologue : tréponème Reiter-sérum de sujet syphilitique.

Après avoir extrait du tréponème l'antigène de groupe sous une forme soluble, il reste un résidu insoluble qui renferme encore une petite partie de ce même antigène : si on épuise le sérum syphilitique avec ce résidu soigneusement lavé, il perd la propriété de réagir avec l'antigène soluble purifié. Par ailleurs, nous avons vu précédemment que lorsqu'on purifie l'antigène de

groupe par précipitation à pH 3,5, il reste dans la solution un autre antigène qui ne réagit qu'avec le sérum de lapin anti-tréponème Reiter ; une partie de cet antigène soluble à pH 3,5 demeure liée, cependant, à l'antigène de groupe, comme en témoignent des épreuves d'épuisement du sérum anti-Reiter avec l'antigène purifié. Ces faits montrent combien il est difficile de dissocier les divers constituants antigéniques du tréponème et de les obtenir à l'état pur, car ils sont liés entre eux. Ces observations font également comprendre que de simples caractères de solubilité ne permettent pas de définir et d'individualiser ces divers antigènes : selon que le tréponème aura subi tel ou tel traitement préalable, un même antigène pourra se trouver dans des produits possédant des caractères de solubilité différents ; inversement, si la dissociation des divers constituants n'a pas été totale, on pourra trouver un même antigène dans des fractions présentant des solubilités différentes.

#### ETUDE DE LA CONSERVATION DES SOLUTIONS ANTIGÉNIQUES ET DE SON EMPLOI DANS LE SÉRODIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS.

Les propriétés antigéniques sont modifiées par les milieux acides et alcalins ; même à 4°, la solution perd progressivement son activité à pH 5 et à pH 11. La solution neutre non tamponnée s'altère lentement lorsqu'on la conserve à 4° ; en dehors de tout développement microbien, le milieu s'acidifie et l'activité sérologique baisse. Nous avons expérimenté plusieurs agents de stabilisation et de conservation : antiseptique (phénol), solutions salines, albumine sérique, glycérol... Nous avons obtenu de très bons résultats en dissolvant l'antigène dans une solution fortement tamponnée à pH 7,2 à 7,4 (phosphate ou véronal) que l'on additionne d'un égal volume de glycérine bidistillée neutre. A la température du laboratoire et même à 37°, les préparations demeurent remarquablement stables. Après des mois de conservation, il ne se produit aucun développement microbien, les solutions restent limpides, l'activité antigénique est constante et il n'apparaît pas de pouvoir anticomplémentaire.

L'emploi de nos préparations d'antigène soluble purifié dans le sérodiagnostic de la syphilis a fait l'objet d'études étendues, portant sur des milliers de sérums fournis par des groupements différents d'individus vivant en France ou dans les territoires d'Outre-Mer (8). On a examiné parallèlement les résultats donnés par l'antigène purifié et par une préparation non purifiée : trépo-

(8) Certaines de ces études ont fait l'objet de publications en cours [5, 6] ou en préparation ; les résultats des autres études nous ont été communiqués par leurs auteurs que nous remercions vivement.

nèmes lavés avec une solution tampon à pH 7,2, soumis à l'action des ultra-sons et conservés dans une solution tamponnée additionnée d'un égal volume de glycérine. Ces deux types de préparation donnent de très bons résultats tant au point de vue sensibilité que du point de vue spécificité. La purification de l'antigène ne semble pas augmenter sa valeur pratique. Peut-être en milieu tropical l'antigène purifié serait-il dans quelques très rares cas plus spécifique que la préparation non purifiée ? Comme les syphilitiques, les pianiques donnent des réactions sérologiques positives avec cet antigène de groupe.

#### RÉSUMÉ.

On décrit une méthode permettant de préparer avec un bon rendement l'antigène protéique de groupe contenu dans le tréponème Reiter.

Cet antigène étant fortement lié aux corps tréponémiques, on favorise sa libération et sa solubilisation par plusieurs traitements successifs : délipidation avec du butanol, alcalinisation à pH 8,5-9 et broyage avec des ultra-sons. L'antigène obtenu sous une forme soluble est purifié par précipitation à pH 3,5 ; ceci permet de le séparer d'un autre antigène qui demeure en solution et qui est propre à la souche Reiter.

La préparation purifiée de l'antigène protéique de groupe contient plusieurs constituants antigéniques qui sont révélés par précipitation en milieu gélifié.

#### SUMMARY

##### THE ANTIGENIC CONSTITUTION OF TREPONEMA.

##### I. — THE PROTEIN ANTIGEN OF REITER'S STRAIN.

Description of a method allowing to prepare with a good yield the group protein antigen of Reiter's Treponema.

This antigen is strongly bound to the Treponema cell. Several successive treatments induce its release and its solubilisation : delipidation by means of butanol, alkalization to pH 8,5-9, disintegration by ultrasonic waves. The antigen obtained is soluble and purified by precipitation at pH 3,5. It can then be separated from another antigen which remains in the solution and is Reiter's antigen.

The purified preparation of the group protein antigen contains several antigenic constituents, which are demonstrated by precipitation in gelified medium.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BROTTES (H.). *Thèse Médecine*, Lyon, 1954.
- [2] DUFFRENE (A.). *Thèse Pharmacie*, Lyon, 1958.
- [3] D'ALESSANDRO (G.), ODDO (F.) et DARDONI (L.). *Ven. Dis. Inform.*, 1950, **31**, 314.
- [4] MORTON (R. K.). *Nature*, 1950, **166**, 1092.
- [5] DAGUET (G. L.), PILLOT (J.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 463.
- [6] PILLOT (J.), NADAL (G.) et BORDIER (J.). *Bull. Soc. Fr. Dermatol.*, 1958, **65**, 304.

# ÉTUDE DE LA FERMENTATION PROPIONIQUE DE LA L(-)THRÉONINE PAR 45 SOUCHES DE BACTÉRIES ANAÉROBIES NON SPORULÉES A GRAM NÉGATIF

par H. BEERENS, J. GUILLAUME et H. PETIT (\*).

(Institut Pasteur de Lille)

Nos études antérieures sur les types fermentaires des bactéries anaérobies non sporulées à Gram négatif [1] nous ont révélé la fréquence de l'acide propionique dans leurs cultures en milieu V. F. glucosé. Les principales espèces qui le produisent appartiennent aux genres *Spherophorus* et *Ristella*. En identifiant l'origine de ce métabolite chez une souche de *Spherophorus freundii*, nous avons montré [2] qu'il résultait de la fermentation de la L(-)thréonine. Nous avons donc recherché si, pour différentes espèces anaérobies à Gram négatif, l'acide propionique pouvait apparaître au cours d'un processus identique.

## SOUCHES.

Quarante-cinq souches ont été étudiées. Elles ont été identifiées par la technique décrite par l'un d'entre nous [3] et classées selon leur type fermentaire d'acidité volatile [4]. La plupart proviennent de notre collection personnelle, quelques-unes nous ont été adressées par le Dr A.-R. Prévot, Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris, que nous remercions très sincèrement. Elles appartiennent aux genres *Ristella*, *Spherophorus*, *Fusiformis*.

*Ristella* (*Bacteroides*) : 8 souches de l'espèce *convexa* (1).

*Spherophorus funduliformis* : 1 ; *necrophorus* : 3 ; *freundii* : 3.

*Fusiformis fusiformis* : 7 ; *polymorphus* : 1 ; *hemolyticus* : 4.

Treize souches étiquetées *F. biacutus* ; elle seront envisagées séparément pour des raisons exposées ci-après.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 octobre 1958.

(1) Nos souches correspondent exactement à la description de l'espèce *Bacteroides convexus* (Eggerth et Gagnon). Nous ne retrouvons pas les caractères généraux du genre *Pasteurella* auquel Prévot rattache cette espèce ; nous les identifions par contre au genre *Ristella* (Prévot) et proposons le nom de *Ristella convexa*.

## TECHNIQUE.

Les bactéries sont cultivées sur milieu V. F. glucosé à 1 p. 100, incubé à 37° durant vingt-quatre heures, recueillies par centrifugation, puis lavées dans un tampon phosphate 0,14 M à pH 7, privé d'oxygène par ébullition préalable. Elles sont ensuite mises en suspension dans un tampon de même formule de telle façon que 1 ml corresponde à 20 ml du milieu de culture initial. Les essais sont réalisés dans des tubes scellés sous vide. Chacun d'eux contient 1 ml d'émulsion bactérienne, auquel on ajoute 1 ml d'une solution à 100  $\mu$ M de L-thréonine ; on incube quarante-huit heures à 37°.

Les déterminations suivantes sont alors effectuées :

1° Chromatographie directe en une dimension des acides aminés utilisant la phase mobile butanol, acide formique, eau (70 ; 30 ; 120 v/v/v). L'estimation quantitative est faite par mesure directe de la densité optique de la totalité du spot, après révélation à la ninhydrine. Lorsqu'une tache ne correspondant pas à la thréonine est décelée, on effectue une chromatographie bidimensionnelle à l'aide des solvants butanol-formique d'une part, phénol-ammoniacque d'autre part.

2° Dosage de l'ammoniaque sur 0,8 ml par la méthode de Raynaud et Gros [5].

3° Chromatographie directe des acides volatils, selon la technique décrite par l'un d'entre nous [6]. Parallèlement, on effectue les dosages d'acidité volatile sur 0,5 ml après distillation.

4° Chromatographie des hydrazones des acides cétoniques suivant la technique d'Isherwood [7]. Le dosage colorimétrique est réalisé sur 0,2 ml par la méthode de Friedmann et Hangen [8].

## RÉSULTATS.

Ils sont exposés dans le tableau I où ils sont exprimés en micromolécules et ramenés à 100  $\mu$ M du substrat.

1° Genre *Spherophorus*. — Le pourcentage des acides volatils produits en culture sur milieu V. F. glucosé est : formique, 0,5 p. 100 ; acétique, 17 p. 100 ; propionique, 37 p. 100 ; butyrique, 45 p. 100.

Dans les conditions décrites ci-dessus, les bactéries non proliférantes dégradent très fortement la thréonine en acide propionique. Les traces d'acides cétoniques retrouvées correspondent à de l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique. En outre, on déce le sur les chromatographies d'acides aminés une tache correspondant à l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique. Nous avons déjà signalé ce fait pour *S. freundii* 165 [9].

2° Genre *Fusiformis*. — Les acides volatils produits en culture sont :

a) Pour *F. fusiformis* : formique, 10 p. 100 ; acétique, 22 p. 100 ; propionique, 1 p. 100 ; butyrique, 67 p. 100.

TABLEAU I.

	Espèce	nombre de souches étudiées	thréonine non dégradée	Ammoniacue	Acides cétoniques	Acides volatils	Acides volatils par chromatographie	Type fermentaire en milieu complexe.
FUSIFORMIS SFEROPHORUS	funduliformis	6	0	85 < q < 90	0 < q < 7	60 < q < 90	propionique	(F) A.P.B.
	necrophorus	3	0 < q < 30	55 < q < 90	0 < q < 4	50 < q < 70	propionique	(F) A.P.B.
	freundii	3	0 < q < 30	55 < q < 90	0 < q < 11	50 < q < 85	propionique	(F) A.P.B.
FUSIFORMIS	fusiformis et nucleatus	7	0 < q < 30	65 < q < 90	17 < q < 45	20 < q < 60	propionique	(F) A. (P) B.
	polymorphus	1	30	65	35	30	propionique	(F) A. (P) B.
	hemolyticus	4	0 < q < 20	70 < q < 90	25 < q < 35	30 < q < 45	propionique	(F) A.P.B.
F. BIACUTUS	II	7	30 < q < 70	20 < q < 70	0 < q < 7	15 < q < 50	propionique	F.A.B. (6 souches) FA (1 souche)
	I	6	100	0	0	0	—	F.A.
RISTELLA BACTEROIDES	convexa	8	100	0 < q < 5	0 < q < 5	0	—	A.P.B.

b) Pour *F. hemolyticus* : formique, 2 p. 100 ; acétique, 33 p. 100 ; propionique, 39 p. 100 ; butyrique, 26 p. 100.

En présence de solution de thréonine les deux espèces font disparaître presque complètement l'acide aminé ; la dégradation n'est cependant pas totale, puisqu'on retrouve des quantités d'acides volatils et d'acides cétoniques identifiés d'une part à l'acide propionique, d'autre part à l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique. Pour chacun de ces germes, nous avons retrouvé des traces d'acide  $\alpha$ -aminobutyrique.

3° Souche étiquetées *F. biacutus*. — Le type fermentaire d'acidité volatile de cette espèce n'est pas homogène. Il révèle en réalité deux groupes que nous désignerons arbitrairement I et II. Le premier (I), produit en culture les acides formique et acétique et le second, les acides formique, acétique et butyrique. Les souches de type fermentaire formique-acétique (groupe I) ne dégradent pas la thréonine à l'exception d'une seule.

Celles de type fermentaire formique-acétique-butyrique (groupe II) transforment la thréonine en acide propionique, sans produire d'acide cétonique. La vitesse de la réaction est faible et la moitié seulement de la quantité initiale est métabolisée durant l'expérience.

4° *Ristella (Bacteroides) convexa* dont le type fermentaire est : formique, 5 p. 100 ; acétique, 67 p. 100 ; propionique, 28 p. 100.

Ces germes ne touchent pas la thréonine, dans nos conditions expérimentales.

## DISCUSSION.

Selon leur aptitude à dégrader la thréonine en acide propionique, on peut classer les différentes espèces étudiées en quatre catégories :

1° Les bactéries qui, fermentant rapidement et totalement la thréonine, font partie du genre *Spherophorus*. En culture d'ailleurs, les *Spherophorus* produisent des quantités importantes d'acide propionique.

2° Celles du genre *Fusiformis* qui dégradent rapidement la thréonine, principalement jusqu'au stade acide cétonique. Ce fait explique le type fermentaire de *F. fusiformis* qui produit peu d'acide propionique en culture. Par contre, *F. hemolyticus* donne, au cours de sa croissance, des quantités appréciables d'acide propionique, alors que les bactéries non proliférantes se comportent comme *F. fusiformis*.

3° Les germes qui fermentent lentement la thréonine en la transformant en acide propionique. Le type fermentaire de ces bactéries est formique-acétique-butyrique à l'exclusion de toute trace d'acide propionique. En culture, la vitesse de dégradation de la

TABLEAU II.

		Dégradation de la thréonine		Production d'acide propionique en milieu complexe
		acide propionique	acide $\alpha$ -cétobutyrique	
Spherophorus	<i>funduliformis</i>	+	0	+
	<i>necrophorus</i>			
	<i>freundii</i>			
Fusiformis	<i>fusiformis</i>	+	+	traces
	<i>polymorphus</i>	+	+	+
	<i>hemolyticus</i>			
Fusiformis biacutus	II	+	0	0
	I	0	0	0
Ristella convexa (Bacteroides)		0	0	+

thréonine semble insuffisante, par rapport aux autres réactions métaboliques pour permettre l'accumulation d'acide propionique. Ce sont les *F. biacutus* du groupe II. Ils s'apparentent ainsi aux espèces du genre *Fusiformis* mais s'en différencient toutefois par l'absence d'acide  $\alpha$ -cétobutyrique.

4° Enfin les bactéries n'attaquant pas la thréonine. Ce sont, d'une part les *Ristella convexa* qui forment pendant au cours de



leur croissance de l'acide propionique et, par conséquent, utilisent pour y parvenir un processus différent de celui envisagé ici ; d'autre part les *F. biacutus* du groupe I qui, par ce caractère, se rapprochent des *Ristella*, mais qui ne produisent pas d'acide propionique en culture.

On peut classer ces groupes comme nous l'indiquons dans le tableau II.

#### CONCLUSIONS.

Dans un travail antérieur, nous avons déjà suggéré que le type fermentaire d'acidité volatile était, pour les bactéries à Gram négatif, un caractère spécifique d'espèce. Nous en décrivons ici un autre : la dégradation de la thréonine en acide propionique qui, outre sa spécificité pour les espèces, permet d'établir quatre groupes parmi les bactéries des genres *Spherophorus*, *Fusiformis* et les *Ristella convexa*. Le premier comprend les *Spherophorus* ; le second les *Fusiformis* (*fusiformis*, *nucleatus*, *polymorphus*, *hemolyticus*) ; le troisième est représenté par certaines souches de *F. biacutus* (type II) s'apparentant à celles du groupe précédent ; le quatrième enfin comprend les *Ristella* et les autres *F. biacutus* (type I). Ce caractère nouveau confirme l'homogénéité des *Ristella convexa*, des *Spherophorus* et des *Fusiformis* tels que nous les concevons. Il annonce le détachement de *Fusiformis biacutus* du genre *Fusiformis* et le démembrement de cette espèce en deux différentes. Un prochain travail traitera de la position taxonomique de ces deux espèces et décrira des caractères utilisables en pratique courante pour les identifier. La réaction décrite ici, en effet, est d'une exécution difficile ; elle nécessite un matériel trop compliqué pour être effectuée dans tous les laboratoires.

#### SUMMARY

STUDIES ON THE PROPIONIC FERMENTATION OF L(-)THREONIN  
BY 45 STRAINS OF ANAEROBIC,  
NON-SPORULATED GRAM-NEGATIVE BACTERIA.

In a previous paper, the authors already suggested that the fermentative type of volatile acidity was a species-specific property of Gram-negative bacteria. In the present report they describe another species-specific character : the degradation of threonine into propionic acid. This property is not only species-specific, it also allows to distinguish four groups among bacteria of the *Spherophorus*, *Fusiformis* and *Ristella convexa* genera. The first one comprises the *Spherophorus* ; the second one, the *Fusiformis* (*fusiformis*, *nucleatus*, *polymorphus*, *hemolyticus*) ; the third one

is represented by certain strains of *F. biacutus* (type II) related to those of the precedent group; the fourth one comprises the *Ristella* and the other *F. biacutus* (type I).

This new property confirms the homogeneity of *Ristella convexa*, *Spherophorus* and *Fusifformis*. It shows that *Fusifformis biacutus* must be excluded from the *Fusifformis* genus and that this species must be divided into two distinct ones. In a further paper, the authors will study the taxonomy of these two species and the properties which allow to identify them in the laboratory routine, the reaction described in the present work being difficult to perform and requiring a complex material.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GUILLAUME (J.), BEERENS (H.) et OSTEUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1956, **8**, 13.
- [2] GUILLAUME (J.), BEERENS (H.) et PETIT (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 946.
- [3] BEERENS (H.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1953-1954, **6**, 36.
- [4] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de Classification et de Détermination des Bactéries anaérobies*, 3<sup>e</sup> édition, Masson, édit., Paris 1957.
- [5] RAYNAUD (M.) et GROS (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 1003.
- [6] GUILLAUME (J.) et OSTEUX (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **241**, 501.
- [7] ISHERWOOD (F. A.) et CRUICKSHANK (D. H.). *Nature*, 1954, **173**, 121.
- [8] FRIEDMANN (T. E.) et HANGEN (G. D.). *J. biol. Chem.*, 1943, **147**, 415.
- [9] GUILLAUME (J.), PETIT (H.) et BEERENS (H.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1947, **9** (*sous presse*).

# LE TAUX DE CROISSANCE DES BACTÉRIES DU SOL EN FONCTION DE LA SOURCE ÉNERGÉTIQUE

## I. — ÉTUDE ET CONSÉQUENCES

par J. AUGIER (\*).

(Institut Pasteur, Paris)

Dans plusieurs notes précédentes [2, 4] nous avons déjà signalé que le taux de croissance des germes présents dans le sol était le plus élevé pour les espèces représentées par un petit nombre d'individus, tandis que les espèces composées d'un grand nombre de germes ont des taux de croissance plus faibles. Les expériences que nous avons faites alors n'avaient pas pour but direct de préciser ce point et ce fut pour nous une constatation inattendue. C'est pourquoi nous avons cherché à étudier ce point d'une manière plus précise en mesurant les taux de croissance au biophotomètre enregistreur. Cette étude nous a paru digne d'intérêt à cause même de la constatation paradoxale à laquelle elle conduit. Dans cette note nous allons d'abord chercher à mettre en évidence le fait expérimental.

### A. — TECHNIQUES ET RÉSULTATS.

Nous procédons d'abord à des dilutions-suspensions de terre de raison 10 par la technique habituelle [5]. Chacune de ces dilutions est ensemencée dans les fioles à faces parallèles du biophotomètre enregistreur (1) rempli aux 4/5 par un milieu de culture composé d'un milieu de base additionné de la matière organique à étudier.

Milieu de base :

Solution de Winogradsky .....	50	cm <sup>3</sup>
Extrait de terre .....	5	cm <sup>3</sup>
Nitrate de potassium .....	0,3	g
Solution d'oligo-éléments [6] .....	0,5	cm <sup>3</sup>
Phosphate monopotassique à 1 p. 100 .....	75	cm <sup>3</sup>
Soude N/10 .....	30	cm <sup>3</sup>
Eau naturelle (puits ou rivière) .....	870	cm <sup>3</sup>

Le pH de ce milieu doit être de 7 à 7,1 après stérilisation à 112° pendant vingt minutes.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

(1) Il s'agit du biophotomètre enregistreur de Bonét-Maury et Jouan.

Les matières organiques étudiées sont les suivantes :

Glucose à la concentration de .....	1 p. 1 000
Saccharose à la concentration de .....	1 p. 1 000
Hémicellulose à la concentration de .....	1 p. 1 000
Gélatine à la concentration de .....	2 p. 1 000
Glycocolle à la concentration de .....	2 p. 1 000
Asparate de sodium à la concentration de ....	2 p. 1 000
Glutamate de sodium à la concentration de ..	2 p. 1 000

Nous avons fait la même expérience en utilisant de l'extrait de terre pur (sans addition de milieu de base).

La température de l'appareil est réglée à 28°.

Chaque fois que la culture d'une fiole est arrivée à la fin de la phase exponentielle, on prélève une goutte pour examen sur lame après coloration à l'érythrosine.

TABLEAU I. — Taux de croissance en fonction de la nature de la source carbonée.

NATURE DE LA SOURCE CARBONÉE	DILUTIONS						
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
GLUCOSE	1,60	1,60	0,80	0,35	-	-	-
SACCHAROSE	1,10	1,10	0,33	0,10	0,10	0,10	-
HEMICELLULOSE	0,68	0,20	0,20	0,18	0,12	0,17	-
GELATINE	0,86	0,24	0,21	0,16	0,08	0,10	-
GLYCOCOLLE	1,34	0,30	0,18	0,08	-	-	-
ASPARTATE	2,68	1,33	0,14	0,13	0,1	-	-
GLUTAMATE	0,44	0,42	0,25	0,26	0,25	-	-
EXTRAIT DE TERRE	-	1,67	1,67	1,10	0,44	0,16	0,09

Les divers taux de croissance obtenus sont groupés dans le tableau I. On voit que dans la plupart des cas le taux de croissance diminue quand la dilution augmente.

L'examen des lames montre que :

a) En général, ce ne sont pas les mêmes germes qui sont rencontrés dans chaque fiole, sauf dans celles correspondant aux

premières dilutions : le plus souvent c'est aux dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ , quelquefois jusqu'à la dilution  $10^{-4}$  et rarement jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ , qu'on retrouve les mêmes espèces en dominance. Ceci est en réalité très variable selon la source de carbone utilisée ; avec les hémicelluloses, par exemple, il n'est pas rare de trouver le même germe jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ , tandis qu'avec le saccharose on ne retrouve les mêmes germes que jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ . Aux dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  les espèces présentes se sont toujours montrées différentes de celles rencontrées aux premières dilutions.

b) Il arrive assez souvent que les germes trouvés dans les dernières dilutions soient plus petits que ceux rencontrés dans les premières. Ceci est loin d'être général, mais dans le cas de l'extrait de terre il en est la plupart du temps ainsi. Il est d'ailleurs aisé de s'en rendre compte au microscope. Avec des mull ou des rendzines on constate en microscopie directe et en fluorescence [7] que les germes qui sont de loin les plus nombreux sont très petits. Nous avons pu isoler l'un d'eux ; il se présente comme un très petit coccus qui n'est bien visible qu'en fluorescence et ne pousse que sur extrait de terre. Son taux de croissance est extrêmement faible, presque pas mesurable (de l'ordre de 0,08). Ce germe est morphologiquement identique à ceux que l'on voit en microscopie directe parmi les plus nombreux. Il semble donc que dans le sol (au moins pour les mull et les rendzines) les espèces dominantes du sol *in situ* soient des germes à très petit taux de croissance, de taille faible ou très faible et ne poussant que sur extrait de terre, c'est-à-dire des germes à besoin métabolique très particulier.

On se trouve donc devant cette situation à priori très paradoxale : les germes à taux de croissance élevé sont moins nombreux que ceux à taux de croissance faible. Cette constatation est exactement l'inverse de celle à laquelle on arrive lorsqu'on ensemente un milieu de culture quelconque avec un mélange de plusieurs espèces de germes capables d'y croître aisément et non antibiotiques les uns pour les autres ; dans ce cas c'est toujours l'espèce à taux de croissance le plus élevé qui domine. Si, dans la terre, nous trouvons un résultat inverse, c'est à coup sûr l'indice d'une physiologie très particulière du milieu sol.

#### B. — CONSÉQUENCES PRATIQUES.

Les causes du phénomène que nous venons de constater ne nous sont pas encore complètement connues. L'interprétation sera donc publiée ultérieurement. Quoi qu'il en soit un fait demeure : les taux de croissance ne sont pas les mêmes à chaque dilution et décroissent lorsque ces dilutions augmentent. Il y a donc intérêt



à être renseigné sur la variation du taux de croissance au cours des analyses de terres ; c'est une information de plus.

a) Les anciennes méthodes de Winogradsky [9] ne permettent de déceler que les germes ayant le taux de croissance le plus élevé et le plus souvent d'une manière qualitative ou très grossièrement quantitative. La notion de quantité ne peut être introduite qu'à l'aide de dilutions qui provoquent un effet de ségrégation par classement quantitatif des différentes espèces microbiennes. Si donc on dispose d'une méthode permettant de mesurer pour chaque dilution le taux de croissance des germes qui dominent les autres par concurrence, on obtiendra un supplément d'information venant s'ajouter à la notion de quantité déjà donnée par les dilutions. De plus, pouvoir déterminer à chaque dilution l'activité du germe qui domine en situation concurrentielle, c'est faire la même chose que d'appliquer les méthodes écologiques qui donnent toujours les germes les plus actifs en concurrence. Une telle méthode permettra de savoir :

1° Dans quelle dilution on trouve les germes à fort taux de croissance (facteur qualitatif) ;

2° Jusqu'à quelle dilution on trouve ces germes (facteur quantitatif) ;

3° La manière dont les taux de croissance diminuent pour les dilutions suivantes.

Les deux premiers points correspondent d'une manière quantitative à la flore mise en évidence par les méthodes écologiques. Le troisième est plus difficile à préciser et sa signification fait partie des interprétations que nous tenterons de donner ultérieurement.

Les méthodes en différentielle permettent de préciser ces trois points.

b) Les méthodes en différentielle ont pour principe : ensemencement d'un milieu électif à l'aide de suspensions-dilutions de terre, recherche chaque jour de la dilution à laquelle la substance testée disparaît à l'aide d'un réactif approprié. Jusqu'ici la méthode est la même que celle utilisée par Pochon et ses collaborateurs [8]. C'est la suite qui en diffère : chaque jour, chercher également à l'aide d'un test convenable à quelle dilution la culture commence sa croissance. On trace les deux courbes obtenues (la courbe de disparition du substrat, qui correspond à la fin de la croissance, et la courbe de début de croissance) sur un système de coordonnées où les abscisses portent le temps et les ordonnées les dilutions. La différence entre les deux courbes est reportée point par point sur un même système de coordonnées. La courbe obtenue, dite courbe différentielle, représente la courbe réelle de disparition du substrat.

Nous avons décrit en détail cette méthode à propos de la mesure

du pouvoir hémicellulolytique des sols [1, 2, 3]. Cette méthode nous paraît très facile à généraliser pour un grand nombre de substances, et nous l'expérimentons de la manière suivante : introduire la substance carbonée à la concentration de 1 p. 1 000 et la source d'azote sous forme de nitrate de sodium de telle sorte que le rapport C/N du milieu soit compris entre 5 et 10. Rechercher le début de l'attaque par la mise en évidence des nitrites à l'aide du réactif de Griess et la disparition du substrat par l'iode s'il s'agit de l'amidon, par la phloroglucine chlorhydrique s'il s'agit des hémicelluloses, par le pouvoir réducteur s'il s'agit d'un sucre. Nos résultats expérimentaux seront publiés très prochainement.

Si la substance choisie contient de l'azote, l'introduction de nitrate n'est plus possible, on aura le choix entre deux solutions :

1° Faire deux séries avec deux concentrations différentes du substrat, rechercher sa disparition, chaque jour dans les deux séries, tracer les deux courbes ; leur différence conduira également à la différentielle.

2° Trouver un test correspondant au début de l'attaque du substrat et un autre à la fin ; par exemple, pour les acides aminés rechercher l'apparition de l'ammoniaque par le réactif de Nessler et la disparition de l'acide aminé par la ninhydrine.

Dans tous les cas on obtiendra le même genre de courbes différentielles que celles déjà obtenues avec les hémicelluloses. La première partie de la courbe, généralement presque verticale, correspond à la flore très active, la même qu'en situation écologique, puis la courbe s'enfléchit et peut devenir presque horizontale. Cette dernière partie correspond au ralentissement du taux de croissance, puisque le temps de consommation s'allonge.

#### C. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Au cours de ce travail nous avons d'abord constaté un fait dont nous avons été nous-mêmes très surpris : le taux de croissance des germes dominants dans un milieu de culture quelconque ensemencé avec des dilutions-suspensions de terre est d'autant plus petit que la dilution ayant servi à l'ensemencement est plus poussée. Nous en avons conclu que, dans le sol, les germes à faible taux de croissance étaient ceux qui appartiennent à des espèces représentées par un grand nombre d'individus. C'est l'inverse pour les germes à taux de croissance élevé. Ce fait est très paradoxal et son interprétation sera publiée ailleurs. Enfin nous exposons le principe d'une méthode générale d'analyse des sols permettant de dénombrer les germes à taux de croissance rapide et les germes à taux de croissance lent. Cette méthode est dite méthode en différentielle et un exemple détaillé en a déjà été publié [1, 2, 3].

## SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN THE ENERGETIC SOURCE  
AND THE GROWTH-RATE OF SOIL BACTERIA.  
STUDY AND CONSEQUENCES.

A surprising fact has been observed : the higher the dilution of the soil suspension inoculated into a culture medium, the lower the growth rate of the main germs developing in this medium. The author concludes that, in soil, the germs possessing a low growth-rate belong to the species represented by a great number of individuals ; it is the contrary for the germs with a high growth-rate.

Finally the author exposes the principle of a general method for analysis of soils allowing to count the germs possessing a rapid growth-rate, and those possessing a slow growth-rate.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1956, **90**, 161.
- [2] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1956, **90**, 637.
- [3] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 369.
- [4] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 604.
- [5] AUGIER (J.). et LAVERGNE (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 766.
- [6] AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 759.
- [7] AUGIER (J.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 615.
- [8] POCHON (J.) et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson, édit., Paris, 1954.
- [9] WINOGRADSKY (S.). *Microbiologie du sol. Problèmes et méthodes. Cinquante ans de recherches*. Masson, édit., Paris, 1949.

**FIXATION DE L'AZOTE**  
**PAR LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES**  
**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE SOUCHES ACTIVES**

par J. LE GALL, J.-C. SENEZ et F. PICHINOTY (\*).

(Centre National de la Recherche Scientifique,  
C. R. S. I. M., Marseille)

Il y a quelques années, Sisler et ZoBell [4] ont publié des observations tendant à démontrer que *Desulfovibrio desulfuricans*, bactérie sulfato-réductrice anaérobie, possédant une hydrogénase très active, peut fixer l'azote moléculaire et se développer autotrophiquement en milieu dépourvu d'azote combiné, dans des conditions où les seules sources de carbone, d'énergie et d'azote sont constituées respectivement par  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{N}_2$ . Pour prouver qualitativement la fixation de l'azote dans leurs cultures, ces auteurs se sont fondés sur le fait qu'après plus de deux mois d'incubation, l'analyse de la phase gazeuse par spectrographie de masse a montré un abaissement de la teneur en  $\text{N}_2$  par rapport à celle d'un gaz inerte, l'argon.

Nous avons pensé qu'il était intéressant de vérifier ces résultats en employant une technique différente et en essayant d'isoler directement des souches de *D. desulfuricans* fixatrices de l'azote.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.**

*Milieux et conditions de culture* : Pour l'isolement, la conservation et l'étude des souches fixatrices d'azote, on a employé des milieux dépourvus d'azote combiné et dont la constitution de base était la suivante :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 3 g ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , traces ; eau distillée, 1 l ; pH 7,2 ; stérilisation : trente minutes à  $110^\circ$ .

La plupart des cultures ont été réalisées dans des ballons de 250 ml contenant 50 ml de ce milieu complété par l'addition de lactate de soude (25 ml/l d'une solution à 60 p. 100). Dans quelques cas, ce substrat a été remplacé par du lactate de lithium ou par du pyruvate de soude cristallisés, à la concentration de 20  $\mu\text{moles/ml}$  de milieu.

(\*) Manuscrit reçu le 6 octobre 1958.

Après ensemencement, les ballons sont remplis d'azote et incubés à l'étuve à 32°. Comme l'azote commercial peut contenir, même lorsqu'on prend la précaution de l'épurer par passage sur de la tournure de cuivre chauffée au rouge, des quantités relativement importantes d'oxygène, plusieurs séries de cultures ont été réalisées dans des tubes à fermentation d'Eldredge remplis d'azote, et où l'oxygène était éliminé en plaçant dans l'un des compartiments 25 ml de pyrogallol à 40 p. 100, alcalinisé par un égal volume de solution saturée de carbonate de soude.

Les essais d'isolement en autotrophie ont été effectués avec le même milieu minéral de base auquel était ajouté aseptiquement, après stérilisation, 0,1 p. 100 de bicarbonate de soude, 0,05 p. 100 de sulfure de sodium et la quantité d'HCl convenable pour ramener le pH à 7,2. Dans le cas de ces cultures autotrophes, les ballons étaient lavés et remplis par un mélange d'hydrogène, d'azote et de CO<sub>2</sub> dans les proportions respectives 70 : 25 : 5 ou 40 : 55 : 5.

*Estimation des densités bactériennes* : Les densités bactériennes ont été déterminées photométriquement, à l'aide d'un photocolorimètre de Blet (filtre Wratten bleu vert n° 75), en se référant à des courbes d'étalonnage établies séparément pour chacune des souches étudiées.

*Dosages de l'azote combiné* : L'azote combiné a été dosé par la méthode de Kjeldhal. Afin de réduire les causes d'erreur, ces dosages ont été effectués directement sur la totalité de chaque culture (50 ml) et on a employé, pour opérer sur ces volumes relativement importants, une technique et un appareillage analogues à ceux qu'utilisent les immuno-chimistes pour le dosage de l'azote dans les complexes antigène-anticorps [2].

*Activités métaboliques* : Les activités métaboliques des suspensions bactériennes non proliférantes ont été déterminées par la méthode de Warburg dans les conditions déjà décrites [3].

*Souches de collection* : Les trois souches de collection, Gaz 54 (NCIB 8386), Canet 41 (NCIB 8393) et Hildenborough (NCIB 8303), dont on a recherché l'aptitude à fixer l'azote, sont des souches non-halophiles de *D. desulfuricans* qui sont conservées au laboratoire depuis plusieurs années par de fréquents repiquages en milieu usuel lactate-sulfates-extrait de levure, où la source d'azote est constituée par 0,1 p. 100 de chlorure d'ammonium.

*Isolement de souches nouvelles fixatrices de l'azote* : Ces souches ont été isolées à partir d'échantillons de sol et d'eau prélevés dans un terrain marécageux sur le rivage nord-est de l'étang de Berre, près de Marseille. Au moment du prélèvement, le sol présentait les caractéristiques suivantes : 65 p. 100 d'humidité, pH 7,2, E<sub>H</sub> = -0,150 V, nombre de bactéries sulfato-



réductrices viables, déterminé par la méthode de Grossman et Postgate [4] : 65 000 par gramme. L'eau prélevée contenait 8 000 bactéries sulfato-réductrices par millilitre. Son pH était de 7,0 et son  $E_{\text{H}}$  légèrement négatif.

Avec ces échantillons d'eau et de sol, on a procédé à de nombreux ensemencements en conditions autotrophes, c'est-à-dire en milieu ne contenant pas de substrat organique, sous atmosphère d'hydrogène et d'azote, mais les résultats de ces essais ont été constamment négatifs. Par contre, les cultures d'enrichissement sous atmosphère d'azote et en milieu contenant du lactate ont toutes présenté un développement bactérien rapide et abondant. Après quatre repiquages successifs, l'examen de ces cultures a montré la présence de trois organismes différents : 1° une bactérie mobile, présente en proportion prédominante, et dont les caractères morphologiques étaient ceux des deux souches de *D. desulfuricans* isolées par la suite ; 2° un spirille de grande taille, mobile, Gram-négatif, qui est actuellement en cours d'isolement et d'identification ; 3° un bacille court, Gram-négatif, très mobile, qui a été isolé et identifié comme appartenant au genre *Azotobacter*. Le développement d'un *Azotobacter* aérobic dans les cultures d'enrichissement s'explique par l'aptitude de cet organisme à pousser sous des pressions partielles d'oxygène très réduites et de l'ordre de celles que contient l'azote de qualité commerciale. Parker [5] a signalé, en effet, qu'*A. vinelandii* et *A. chroococcum* fixent l'azote beaucoup plus activement en présence de 0,1 à 4 p. 100 d'oxygène que dans l'air. D'autre part, il est intéressant de noter qu'*Azotobacter* a pu se développer dans des cultures où s'effectuait une intense réduction des sulfates. Ce fait indique une tolérance remarquable à l'égard d'un potentiel d'oxydo-réduction fortement négatif et d'une concentration très élevée en  $\text{H}_2\text{S}$  (environ 350 mg/l).

Par repiquage en gélose profonde, dans un milieu lactate-sulfates contenant 0,1 p. 100 de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et une trace de sel de Mohr, on a obtenu de petites colonies noires, sphériques, non gazogènes, qui ont été transférées en milieu liquide. Après un second passage et isolement de colonies en gélose profonde, on a finalement conservé deux souches, provenant l'une des échantillons initiaux de sol (« Berre S ») et l'autre des échantillons d'eau (« Berre E »).

La pureté de ces souches a été contrôlée par examens microscopiques répétés et vérifiée par l'absence de développement dans les conditions suivantes : Difco Brain Heart en aérobiose et en anaérobiose, milieu glucose-sulfates en anaérobiose, milieu de Starkey lactate-sulfates-extrait de levure en aérobiose, et les milieux classiques pour la culture des *Azotobacter* et de *Clostridium pasteurianum* [6]. Un dernier contrôle de pureté a été effectué

par les laboratoires de la *National Collection of Industrial Bacteria*, où les deux souches ont été enregistrées et conservées sous les numéros NCIB 8387 (Marseille-Berre Eau) et NCIB 8388 (Marseille-Berre Sol).

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1° *Caractères morphologiques et propriétés physiologiques des deux souches nouvelles.* Morphologiquement, les deux souches Berre S et E ont des caractères identiques. Ce sont des bactéries Gram-négatives, non sporulées dans les milieux et les conditions de culture employés, très mobiles, monotriches, mesurant 1,5 à 3  $\mu$  sur 0,2 à 0,3  $\mu$ . Cultivées en milieu de Starkey usuel, où la source d'azote est le chlorure d'ammonium, ces organismes ont la forme de vibrions faiblement incurvés. Par contre, dans les cultures où elles fixent l'azote, les cellules sont rigoureusement droites.

L'examen spectrophotométrique des extraits, obtenus par autolyse aqueuse des bactéries séchées, montre les pics d'absorption caractéristiques [7] du cytochrome  $c_3$  (maximums, pour la forme réduite, à 418, 522 et 552  $m\mu$ ) et de la désulphoviridine (maximums à 410 et à 630  $m\mu$ ).

Sur le tableau I sont rapportées les activités métaboliques des suspensions bactériennes non proliférantes, récoltées à partir de cultures en milieu de Starkey, c'est-à-dire en milieu lactate-sulfates-extrait de levure contenant 0,1 p. 100 de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Ces activités sont très semblables pour les deux souches considérées et, dans leur ensemble, comparables à celles des autres souches pures de *D. desulfuricans*. Le pyruvate et le lactate sont rapidement dégradés dans les systèmes où le sulfate sert d'accepteur d'électrons et, avec le pyruvate, on relève même une activité plus grande en présence de sulfate qu'en présence de sulfite. Les deux souches possèdent, d'autre part, une hydrogénase active, comme le montre la valeur élevée de leurs  $-\text{Q}_{\text{H}_2}$  en présence de benzylviologène, et consomment activement l'hydrogène lorsque l'accepteur est constitué par le sulfite ou par le thiosulfate de soude. En présence de sulfate, par contre, la consommation de l'hydrogène est très lente, ce qui contraste avec le comportement de nombreuses autres souches pures de *D. desulfuricans* et paraît être dû à une anomalie du système transporteur couplant l'hydrogénase avec la sulfate-réductase.

2° *Fixation de l'azote.* Les deux souches Berre S et E ont été repiquées un grand nombre de fois consécutives en milieu dépourvu d'azote combiné et où  $\text{N}_2$  est la seule source d'azote disponible. Dans ces cultures, la croissance totale est atteinte au bout d'environ trois jours d'incubation à 32°.

TABLEAU I. — Activités métaboliques des souches fixatrices de l'azote.

Systèmes		Souches	
		BERRE S	BERRE E
lactate + sulfate	+ $Q_{CO_2}$	35	50
pyruvate + sulfate	+ $Q_{CO_2}$	75,5	75
pyruvate + sulfite	+ $Q_{CO_2}$	53	58
glucose + sulfate	+ $Q_{CO_2}$	0	0
H <sub>2</sub> + benzyl-viologène	- $Q_{H_2}$	2.720	1.650
H <sub>2</sub> + sulfite	- $Q_{H_2}$	105	53,5
H <sub>2</sub> + thiosulfate	- $Q_{H_2}$	180	66
H <sub>2</sub> + sulfate	- $Q_{H_2}$	6,8	7

Conditions expérimentales : Suspensions de bactéries non proliférantes récoltées à partir de cultures en milieu de Starkey contenant 0,1 p. 100 de  $NH_4Cl$ . Activités exprimées en millimètres cubes de  $CO_2$  dégagés (+  $Q_{CO_2}$ ) ou d' $H_2$  consommés (-  $Q_{H_2}$ ) par heure et par milligramme de bactéries, poids sec.

La croissance bactérienne obtenue dans ces conditions est bien due à la fixation de l'azote gazeux, et non pas à des impuretés azotées, pouvant être apportées par certains constituants du milieu et notamment par le lactate de soude. Ce fait est démontré par l'absence complète de développement des cultures-témoins incubées sous vide et, d'autre part, par le développement positif des cultures en milieux contenant, au lieu de lactate de soude, une faible quantité (20  $\mu$ moles/ml) de lactate de lithium ou de pyruvate de soude purs, cristallisés.

Les mesures de la densité bactérienne à croissance totale et les dosages de l'azote combiné (tableau II) confirment que les cultures fixent l'azote et fournissent une estimation quantitative du phénomène. En milieu au lactate de soude, les deux souches fixent la même quantité d'azote (14  $\mu$ g/ml). Les densités bactériennes moyennes sont, par contre, plus élevées pour Berre S (127,7  $\mu$ g/ml) que pour Berre E (104  $\mu$ g/ml). Il est possible que cette différence soit due à ce que la première souche synthétise un constituant cellulaire non azoté, par exemple un polysaccharide, qui ne serait pas produit ou serait formé en quantités moindres par la seconde souche. Quoi qu'il en soit, il convient de souligner que les quantités d'azote fixées représentent 11 à 13,5 p. 100 du poids sec des bactéries, proportion à laquelle on doit s'attendre

si on suppose que la totalité de l'azote fixé est incorporée dans les protéines bactériennes.

Il ne semble pas que l'hydrogène moléculaire inhibe la fixation de l'azote par les souches étudiées. En effet, on a procédé à une série de cultures en milieu au lactate, dépourvu d'azote combiné, et où la phase gazeuse était constituée par un mélange contenant  $N_2$  et 20 ou 40 p. 100 d' $H_2$ . Dans ces conditions, on a obtenu un développement bactérien aussi rapide et abondant que sous atmosphère contenant seulement  $N_2$ .

TABLEAU II. — Déterminations quantitatives de la croissance et de l'azote fixé dans les cultures.

	µg (poids sec) de bactéries par ml de culture	azote combiné ( µg/ml )	
		total	fixé
<u>Milieu au lactate de Na</u>			
Témoins non-ensemencés			
moyenne :	0	0,7	-
Souche Berre S:			
culture n° 1	96	15,2	14,5
2	96	15,7	15,0
3	112	15,1	14,4
4	96	13,5	12,8
5	120	14,5	13,8
moyenne:	104 ± 16		14,0 ± 1,0
Souche Berre E:			
culture n° 1	128	15,2	14,5
2	130	15,4	14,7
3	124	13,8	13,1
4	132	14,2	13,5
5	128	14,4	13,7
6	124	14,9	14,2
moyenne:	127,7 ± 4,3		14,0 ± 0,5
<u>Milieu au lactate de Li</u>			
Souche Berre S			
Témoin (milieu ensemencé et incubé sous vide)	0,68	0,53	-
Culture sous azote :	47,20	6,80	6,27

On a recherché, enfin, si certaines souches pures de *D. desulfuricans*, isolées et conservées depuis plusieurs années, sont également capables de fixer l'azote gazeux. Parmi les trois souches employées dans ce but, une seule (Gaz 54) s'est montrée douée

de cette propriété. Il est néanmoins possible que les deux autres souches (Canet 41 et Hildenborough) aient perdu leur activité au cours de leurs nombreux repiquages en milieux artificiels, contenant de l'azote combiné. Pour déterminer si la fixation de l'azote par *D. desulfuricans* est une propriété générale ou occasionnelle de l'espèce, il conviendrait de rechercher ce caractère sur un grand nombre de souches différentes, fraîchement isolées.

#### DISCUSSION.

Nos observations concordent avec celles de Sisler et ZoBell [4] dans la mesure où elles démontrent que certaines souches de *D. desulfuricans* sont capables de fixer l'azote gazeux. Toutefois, une différence importante de nos résultats avec ceux de ces auteurs est que nous n'avons pas constaté de fixation de l'azote en autotrophie, c'est-à-dire en milieu ne contenant pas de substrat organique et où la seule source disponible d'énergie est l'hydrogène moléculaire.

Dans le cadre des discussions récentes sur la participation possible de l'hydrogénase au processus de fixation de l'azote [8], il faut souligner le fait que l'hydrogène moléculaire n'inhibe pas la fixation de  $N_2$  par nos souches de *D. desulfuricans*, lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu où la source d'énergie est un composé organique. Ce comportement rapproche *D. desulfuricans* de *Clostridium pasteurianum*, autre bactérie anaérobie, possédant une hydrogénase, et chez qui Rosenblum et Wilson [9] ont constaté que des pressions partielles d' $H_2$  semblables à celles que nous avons employées n'inhibent pas la fixation de l'azote. Il diffère, par contre, du comportement des organismes aérobies *Azotobacter* et *Rhizobium*, qui ne fixent pas l'azote en présence d' $H_2$  [10, 11, 12].

#### RÉSUMÉ.

1° Deux souches pures de *Desulfovibrio desulfuricans*, fixatrices de l'azote, ont été isolées directement à partir de cultures d'enrichissement où  $N_2$  était la seule source d'azote et où la source d'énergie était constituée par du lactate de soude. Parmi trois souches de collection qui ont été soumises aux mêmes conditions, une seule s'est montrée capable de fixer l'azote gazeux.

2° L'hydrogène moléculaire ajouté dans la phase gazeuse à la concentration relative de 40 p. 100 n'inhibe pas la fixation de l'azote par ces microorganismes.

3° Les essais qui ont été faits dans le but d'isoler des souches de *D. desulfuricans* capables de fixer l'azote autotrophiquement, c'est-à-dire dans des conditions où  $H_2$  était la seule source énergétique, ont été négatifs.



## SUMMARY

NITROGEN FIXATION BY SULPHATE-REDUCING BACTERIA.  
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTIVE STRAINS.

1. Two nitrogen-fixing strains of *Desulfovibrio desulfuricans* have been directly isolated and purified from enrichment cultures with  $N_2$  as only nitrogen source and sodium lactate as energy source. Among three pure strains from culture collections which have been tested in the same way, only one was able to fix gaseous nitrogen.

2° Molecular hydrogen, at 40 % concentration, does not inhibit nitrogen fixation by these microorganisms.

3. Several attempts have been made in order to isolate strains of *D. desulfuricans* able to fix nitrogen autotrophically in conditions where  $H_2$  is the only possible energy source, but the results have been entirely negative.

## NOTE.

Alors que ce travail était en cours de rédaction, le Dr R. H. Burris a bien voulu vérifier, par sa technique d'incorporation de  $^{15}N$ , que nos souches sont effectivement fixatrices de l'azote. Nous le remercions très vivement pour cette importante confirmation expérimentale.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SISLER (F. D.) et ZOBELL (C. E.). *Science*, 1951, **413**, 511.
- [2] LOISELEUR (J.). *Techniques de Laboratoire*, Masson, édit., Paris, 1954, p. 828.
- [3] SENEZ (J.-C.) *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 541.
- [4] GROSSMAN (J. P.) et POSTGATE (J. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **42**, 429.
- [5] PARKER (C. A.). *Nature*, London, 1954, **473**, 780.
- [6] STEPHENSON (M.). *Bacterial Metabolism*, Longmans Green, édit., London, 1949, p. 316.
- [7] POSTGATE (J. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 545.
- [8] SHUG (A. L.), HAMILTON (P. B.) et WILSON (P. W.). *Inorganic Nitrogen Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 344.
- [9] ROSENBLUM (E. D.) et WILSON (P. W.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 83.
- [10] BACH (M. K.). *Thèse*, Univ. Wisconsin, 1955.
- [11] KLOTZ (I. M.) et KLOTZ (T. A.). *Science*, 1955, **421**, 477.
- [12] WILSON (P. W.) et BURRIS (R. H.). *Bact. Rev.*, 1947, **41**, 41.

**RECHERCHES**  
**SUR DES SOUCHES D'ESCHERICHIA FREUNDII**  
**A ANTIGÈNE Vi ET LEUR POSITION**  
**DANS LE GROUPE DES ESCHERICHIA FREUNDII**

par S. SCHÄFLER et S. BENES (\*).

(Institut D<sup>r</sup> I. Cantacuzène, Bucarest, Roumanie)

Nous nous sommes proposé d'étudier certaines souches d'*E. freundii*, caractérisées par la présence de l'antigène Vi et d'établir les relations qui peuvent éventuellement exister entre ces souches et d'autres souches d'*E. freundii*, dépourvues de structures antigéniques propres aux *Salmonella*.

A ce propos, nous avons étudié les antigènes O et H des souches d'*E. freundii* à antigène Vi.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.**

Nous avons étudié 18 souches lactose-positives d'*E. freundii* à antigène Vi, isolées en Roumanie [1, 2] et 12 souches à antigène Vi, obtenues du D<sup>r</sup> F. Kauffmann, parmi lesquelles quatre possèdent les antigènes O 31 et H 1,5 (coli 1), 7 souches lactose-négatives à antigène O de type 29 (Ballerup) et 1 souche à antigène O 5 (3796).

Le groupe témoin des souches lactose-positives d'*E. freundii* dépourvues d'antigène Vi, a été représenté par 53 souches.

Toutes les souches étudiées possèdent les caractères biochimiques typiques de ce groupe.

Les fermentations des glucides de ces mêmes souches ont été étudiées sur trois milieux de culture : 1° dans l'eau peptonée, additionnée de 0,5 p. 100 de chaque glucide étudié ; 2° dans le milieu de Koser dépourvu de citrate et additionné de 0,2 p. 100 de peptone Witte, 0,002 p. 100 de bleu de bromothymol et 0,5 p. 100 de chaque glucide (milieu de Koser modifié peptoné) ; 3° dans le même milieu gélosé (0,004 p. 100 de bleu de bromothymol et 2 p. 100 de gélose). Tous ces milieux ont été utilisés, tant pour mettre en évidence les fermentations primaires, que les fermenta-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 octobre 1958.

tions mutatives. L'apparition des colonies-filles a été suivie sur deux milieux : sur le troisième des milieux décrits ci-dessus et sur gélose nutritive additionnée de 0,009 p. 100 de brome-crésol-pourpre, 0,0025 p. 100 de bleu de méthylène et 0,5 p. 100 de glucide.

L'utilisation des substances organiques comme unique source de carbone (0,2-0,5 p. 100) a été testée dans le milieu salin de Koser dépourvu de citrate avec 0,001 p. 100 de bleu de bromothymol.

### RÉSULTATS.

I. DONNÉES SÉROLOGIQUES. — Dans le tableau I sont indiqués les résultats obtenus par l'étude comparative des antigènes O des souches à antigènes Vi, isolées en Roumanie, avec ceux de certaines souches de type antigénique O : 5, 29 et 31, c'est-à-dire les types antigéniques d'*E. freundii*, chez lesquels Kauffmann [3, 4, 5], West et Edwards [6] et autres ont signalé la présence de l'antigène Vi.

TABLEAU I. — Agglutinations « O » des souches d'*E. freundii* à antigènes Vi.

Souches	Sérums avec lesquels on a effectué les agglutinations						
	5964 "O" A	6203	22.019 "O" B	7569 "O" 29	Ballerup 107 "O" 29	5396 "O" 31	3796 "O" 5
5964, 6231, 6302, 6317, 6324, 6334, 6403, 6419, 6434, 6561.	+	-	-	-	-	-	-
6203	-	+	-	-	-	-	-
22019	-*	-	+	-	-	-	-
7569, 7666, "P", Ballerup 107	-	-	-	+	+	-	-
1743, 2624, 5286, 6179	-	-	-	-	-	+	-
3796	-	-	-	-	-	-	+

+ = agglutination au titre du sérum ; — = absence d'agglutination ; \* = la souche 22019 est agglutinée par le sérum 5964, au titre de 1/600, le titre du sérum étant de 1/3200.

Les souches n<sup>os</sup> 5964, 6203 et 22019 à antigène Vi possèdent un antigène O différent de celui des souches de type O : 5, 29 et 31, chez lesquelles l'antigène Vi a déjà été signalé. Nous avons provisoirement désigné l'antigène O de la souche 5964, par le symbole « A » et celui de la souche 22019 par « B ». La souche 6203 est probablement une forme dégradée de type « A ».

Toutes les souches de type « A » et la souche 6203 possèdent un antigène H commun, différent de l'antigène H des autres souches, dénommé, à titre provisoire « a ». La souche 22019 contient également un antigène H dénommé « b », différent de l'antigène H des autres types d'*E. freundii* à antigène Vi.

Les souches de type 29, 7569 et 7668 possèdent l'antigène H 82 commun avec celui de la souche Ballerup 16385, la souche « P » possède l'antigène H 73 identique à celui de la souche Ballerup 107.

Les souches de type « A », 22019 et 6203 sont agglutinées aux titres 1/400-1/800, par le sérum anti-S. *typhi* Vi I Bathnagar (titre 1/1200) et déterminent chez le lapin l'apparition d'agglutinines Vi aux titres 1/800-1/3 200. Les souches de type « A », et surtout la souche 6203, protègent 90 à 100 p. 100 des souris inoculées avec 2 à 3 DLM de la souche Ty 2.

Nos essais pour déceler la présence des antigènes « A » et « B » chez 150 souches d'*E. coli*, chez 73 différentes souches de *Salmonella* et chez 81 souches d'*Aerobacter aerogenes*, sont restés sans résultat.

Parmi les 53 souches d'*E. freundii* dépourvues d'antigène Vi, nous avons trouvé l'antigène « A » chez une souche (B 120), l'antigène « B » chez deux souches (B 119, B 145) et les deux antigènes chez la souche B 258.

Ces souches à antigènes « A » et « B », pratiquement dépourvues d'antigène Vi, sont sensibles au phage Vi I de Craigie et Yen et adsorbent le phage Vi II, comme les souches de type « A » et « B » à antigène Vi.

II. DONNÉES BIOCHIMIQUES. — 1° *Utilisation de certaines substances organiques comme source de carbone.* — Nous n'avons pas constaté de différence entre les souches à antigène Vi et celles qui en sont dépourvues, en ce qui concerne l'utilisation des acides aminés, acides organiques et nucléosides, comme unique source carbonée, à l'exception de deux souches à antigène Vi, du type sérologique 31, et deux souches qui en sont dépourvues, qui ne se développent pas sur l'histidine.

2° *La fermentation des glucides par les souches d'E. freundii à antigène Vi.* — Les souches à antigène Vi ont un comportement identique envers les 16 glucides essayés, qui ont été fermentés en douze à vingt-quatre heures. En outre, ces souches fermentent en trente-six à quarante-huit heures le D-arabinose, en trente-six à quatre jours la cellobiose, en quatre à trente jours la salicine, l'arbutine, le sorbose et le raffinose. Elles n'attaquent pas l'adonitol, l'esculine, l'inositol, le saccharose, l'insuline, le D-xylose, la saligénine et l'amygdaline. Nous avons constaté des

différences entre les souches Vi, en ce qui concerne la fermentation du lactose, de la dulcité et de l' $\alpha$ -méthyl glucoside. Ces différences semblent être liées à la structure antigénique des souches. Toutes les souches de type « A », de même que les souches 6203 et 22019 (isolées à Bucarest), attaquent le lactose, la dulcité et le méthyl glucoside. Les souches de type 31 (coli 1) fermentent le lactose et ne fermentent pas la dulcité et l' $\alpha$ -méthyl



FIG. 1.

glucoside. Les souches de type 29 (Ballerup) se comportent de manière variable, à l'égard de ces trois glucides.

3° La fermentation des glucides par les souches d'*E. freundii* dépourvues d'antigène Vi. — Vis-à-vis des glucides qui sont attaqués rapidement ou pas du tout, nous avons constaté un comportement presque identique chez les souches dépourvues d'antigène Vi et chez les souches contenant cet antigène. Les dissémbances les plus typiques entre ces deux groupes d'*E. freundii* se rapportent aux glucides qui sont attaqués tardivement par les souches Vi (fig. 1).



De ce graphique il ressort que la salicine, le cellobiose, l'arbutine, le sorbose et le raffinose, sont plus rapidement fermentés par la plupart des souches dépourvues d'antigène Vi que par les souches qui possèdent cet antigène. Chez certaines souches, une fermentation rapide du raffinose est accompagnée par celle du saccharose. Il faut souligner que la fermentation tardive de tous ces glucides, qui est propre aux souches Vi, a été toutefois constatée chez quatre souches dépourvues d'antigène Vi.

Pour préciser les dissemblances entre les souches équipées d'antigène Vi et celles qui en sont dépourvues, nous avons essayé d'étudier la nature des fermentations tardives.

De ce point de vue, les glucides à liaison  $\beta$ -glucosidique (cellobiose, arbutine et salicine) semblent être attaqués de la même manière. L'incubation prolongée en présence de cellobiose accélère la fermentation ultérieure de la salicine et de l'arbutine. Les souches qui ont attaqué la salicine acquièrent la capacité de faire fermenter rapidement le cellobiose et l'arbutine.

Les souches Vi de type antigénique A, B et 6203 attaquent d'une manière primaire les glucides à liaison  $\beta$ -glucosidique, le cellobiose étant fermenté plus rapidement que l'arbutine et surtout que la salicine.

L'incubation prolongée (surtout sur des milieux de salicine) peut faire apparaître des variantes qui fermentent de manière mutative les trois glucides mentionnés. Ceci explique l'influence favorable de l'incubation prolongée en présence de l'un de ces trois glucides sur la fermentation des deux autres.

Chez certaines souches de type 29 (Ballerup) et 31 (coli 1), la fermentation primaire des glucides à liaison  $\beta$ -glucosidique est remplacée presque entièrement par une fermentation mutative.

Nous avons constaté que la fermentation rapide des  $\beta$ -glucosides par certaines souches dépourvues d'antigène Vi est une fermentation primaire intense, ou bien primaire faible, suivie par une fermentation mutative plus intense que celle des souches à antigène Vi. Les autres souches dépourvues d'antigène Vi fermentent les  $\beta$ -glucosides de la même manière que les souches de type A.

Le raffinose est fermenté par toutes les souches Vi, de manière mutative, au niveau de la liaison  $\alpha$ -galactosidique, tandis que la majorité des souches dépourvues d'antigène Vi attaquent le raffinose de manière primaire, au niveau de la liaison  $\beta$ -fructosidique. Les autres souches dépourvues d'antigène Vi attaquent le raffinose de manière primaire ou mutative, au niveau de la liaison  $\alpha$ -galactosidique.

Chez toutes les souches à antigène Vi la fermentation du sorbose est mutative et de faible intensité, 74 p. 100 des souches

dépourvues d'antigène Vi fermentant le sorbose de manière primaire, tandis que 26 p. 100 seulement l'attaquent de manière mutative.

#### CONCLUSIONS.

Nos résultats, en accord avec les données de la littérature, prouvent que l'apparition de l'antigène Vi chez *E. freundii* est conditionnée par l'existence de certaines structures antigéniques O (les antigènes O 5, 29 et 31 et les antigènes O provisoirement dénommés « A », « B » et 6203).

En ce qui concerne l'action fermentaire, les souches à antigène Vi se comportent d'une façon plus uniforme que les souches qui sont dépourvues de cet antigène.

Les souches Vi se caractérisent par une fermentation primaire plus faible ou mutative de certains glucides et par l'absence de fermentation du saccharose, tandis que la majorité des souches dépourvues d'antigène Vi font fermenter intensément ces glucides. Un processus d'orthogénèse, manifesté par l'affaiblissement de certains caractères fermentaires, semble se dérouler au cours de l'évolution phylogénétique des souches à antigène Vi.

Il est probable qu'un processus analogue a eu lieu pendant l'évolution des formes lactose-négatives Bethesda-Ballerup.

#### SUMMARY

##### STUDIES ON *Escherichia freundii* STRAINS POSSESSING VI ANTIGEN AND THEIR PLACE IN THE *Escherichia freundii* GROUP.

The findings show, according to the results reported in the literature, that the appearance of Vi antigen in *E. freundii* depends on the existence of certain antigenic O structures (O 5, 20 and 31 antigens and the O antigens temporarily called « A », « B » and 6203).

As to the fermentative capacity, the strains possessing the Vi antigen show a more uniform activity than those which are deprived of this antigen.

Vi strains are characterized by a weaker or mutative primary fermentation of certain glucides and by the absence of fermentation of sucrose, whereas the majority of strains deprived of Vi antigen strongly attack these glucides.

An orthogenesis process, evidenced by an attenuation of certain fermentative properties, seems to take place in the course of the phylogenetic evolution of the strains possessing the Vi antigen. It is probable that an analogous process has also taken place during the evolution of the lactose-negative Bethesda-Ballerup forms.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALS (M.) et MEITERT (E.). *Rev. Microbiol.*, 1957, 549.
  - [2] ZALMAN (M.), LEVIN (S.) et REICHRATH (S.). *Communic. Acad. R. P. R.*, 1956, **12**, 171.
  - [3] KAUFFMANN (F.). *Bakteriologie der Salmonella Gruppe*, Munksgaard, édit., Copenhagen, 1941.
  - [4] KAUFFMANN (F.) et MÜLLER (E.). *J. Hyg.*, 1940, **40**, 246.
  - [5] KAUFFMANN (F.). *Enterobacteriaceae*, Munksgaard, édit., Copenhagen, 1954.
  - [6] WEST (G.), EDWARDS (P. R.). *Public Hlth Monograph.*, 1954, n° 22.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 4 Décembre 1958.

Présidence de M. PRÉVOT.

## COMMUNICATIONS

### ACTIVITÉ DE L'(HYDROXY-2'ÉTHYL)-1 MÉTHYL-2 NITRO-5 IMIDAZOLE (8.823 R.P.)

#### VIS-A-VIS DES INFECTIONS EXPÉRIMENTALES A *TRICHOMONAS VAGINALIS*

par C. COSAR et L. JULOU.

(présenté par M. BÉNAZET).

(Laboratoires de Recherches  
de la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc, Vitry-sur-Seine.)

Au cours de nos recherches sur les produits inhibant le développement de *Trichomonas vaginalis* nous avons trouvé actif un antibiotique, le 7080 R. P., produit en même temps que deux autres (6237 R. P. et 7071 R. P.) par une souche de *Streptomyces* isolée dans nos laboratoires : souche 6670 [2].

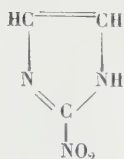
Plus tard, nous avons reconnu que le 7080 R. P. est lui-même constitué par un mélange de deux antibiotiques dont l'un, le seul actif sur *T. vaginalis*, s'identifie avec l'azomycine de Nakamura [5] qui n'est autre que le nitro-2 imidazole.

Nous avons poursuivi nos investigations dans le domaine des nitro-imidazoles et, parmi les nombreux dérivés de cette série que nous avons examinés du point de vue de leur activité sur *Trichomonas*, nous avons retenu le 8823 R. P. [(hydroxy-2' éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole] comme le plus intéressant des produits essayés.

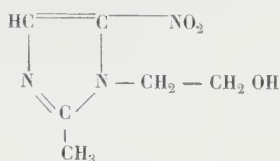
Au cours de nos essais, nous avons utilisé, comme termes de comparaison, l'azomycine et l'aminitroazole (acétamido-2 nitro-5 thiazole)

déjà proposé par Cuckler, Kupferberg et Millman [4] comme médicament de la trichomonose.

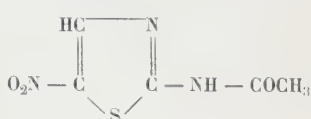
Les formules de ces trois produits sont les suivantes :



azomycine



8 823 R.P.



aminotrozole

**TOXICITÉ EN DOSE UNIQUE.** — Nous avons comparé le 8823 R. P. à l'aminotrozole et à l'azomycine. Les souris de 13 à 18 g reçoivent les produits *per os* en suspension gommeuse, chaque dose étant contenue dans 1 ml/20 g ; les animaux sont observés pendant cinq jours.

La dose 50 p. 100 létale (DL<sub>50</sub>) du 8823 R. P. est de 4,3 g/kg *per os*, celle de l'aminotrozole de 0,63 g/kg *per os* et celle de l'azomycine de 0,15 g/kg *per os*.

**TOXICITÉ EN ADMINISTRATIONS RÉPÉTÉES** (cinq jours). — Ces essais ont été faits en vue de déterminer les doses maximum non mortelles (DL<sub>0</sub>) pour les traitements des animaux dans la trichomonose de la souris. Les souris reçoivent les produits dans les mêmes conditions que dans les essais de toxicité aiguë, mais on fait une administration quotidienne pendant cinq jours consécutifs et on observe les animaux traités pendant cinq jours après la dernière administration.

Les doses maximum tolérées sont alors respectivement de 2,5 g/kg *per os* par jour pour le 8823 R. P., de 0,20 g/kg *per os* par jour pour l'aminotrozole et de 0,05 g/kg *per os* par jour pour l'azomycine.

**TOXICITÉ CHRONIQUE** (un mois). — Dix rats albinos de 150 g environ ont reçu pendant un mois une dose quotidienne de 50 mg/kg *per os* de 8823 R. P., et dix autres une dose de 25 mg/kg *per os* ; dix rats non traités ont servi de témoins. Les trois lots d'animaux ont suivi le même accroissement de poids et ont présenté un comportement normal. Les examens hématologiques, biologiques (système hépatico-rénal) et histologiques (foie, reins, poumons, cœur, estomac, intestin, pancréas, rate, thyroïde, surrénales et névraxe) ont donné des résultats identiques chez les animaux témoins et chez les traités.

Deux chiens ont reçu pendant le même temps une dose quotidienne de 100 mg/kg *per os* de 8823 R. P., deux autres chiens 50 mg/kg *per os* et deux autres 25 mg/kg *per os*. Aucune anomalie n'a été constatée ni dans le poids des animaux, ni au cours des examens hématologiques, biologiques et histologiques.

**ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE *in vitro*.** — Nous avons utilisé le milieu décrit par Sorel [6] et nous avons déterminé les concentrations minimum permettant de tuer 99 p. 100 des *T. vaginalis* en vingt-quatre heures. Ces concentrations sont 1 p. 400 000 pour le 8823 R. P., 1 p. 75 000 pour l'aminotrozole et 1 p. 25 000 pour l'azomycine.



ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE *in vivo*. — Nous avons utilisé la technique d'inoculation décrite par Lynch, Holley et Margison [4]. On injecte, sous la peau dorsale des souris 0,5 ml de culture de quarante-huit heures de *T. vaginalis* en milieu de Kupferberg [3]. Après sept jours, on sacrifie les animaux et on observe macroscopiquement et microscopiquement l'espace hypodermique inoculé : chez les animaux témoins, se sont développées des collections purulentes où pullulent les *Trichomonas*.

Les animaux soumis aux essais sont traités *per os* tout de suite après l'inoculation et une fois par jour pendant les quatre jours suivants.

Pour qu'un animal soit considéré comme protégé, il faut que son hypoderme dorsal reste normal et qu'il ne présente pas de *Trichomonas* au microscope sur un frottis.

TABEAU I. — Activité anti-*Trichomonas* chez la souris.

Produits	Doses en mg/kg p.o./jour données 5 jours	Souris protégées Souris traitées	Fractions approximatives de la DL <sub>0</sub> nécessaires à la protection
8.823 R.P.	500	6/6	$\frac{12,5}{2.500} = \frac{1}{200}$
	150	6/6	
	50	12/12	
	25	6/6	
	15	6/6	
	12,5	12/12	
	6	9/12	
	3	1/12	
	1,5	0/6	
aminotrozole	200	6/6	$\frac{100}{200} = \frac{1}{2}$
	100	12/12	
	35	4/6	
	25	3/6	
	10	1/12	
azomycine	50	43/43	$\frac{50}{50} = \frac{1}{1}$
	25	5/6	
	15	21/44	
	8,5	1/6	
	5	0/42	
Témoins non traités		5/99	

Les résultats des essais relatifs au 8823 R. P. et aux deux produits témoins sont réunis dans le tableau ci-joint où l'on voit qu'il suffit d'une dose égale au 1/200 de la DL<sub>0</sub> du 8823 R. P. pour protéger les souris dans cette épreuve, alors que, dans le cas de l'aminotrozole, il faut employer la moitié de la DL<sub>0</sub> et qu'on doit à peu près atteindre la DL<sub>0</sub> pour arriver au même résultat avec l'azomycine.

ÉLIMINATION URINAIRE CHEZ LE RAT. TITRAGE BIOLOGIQUE. — Après une administration unique de 250 mg/kg *per os*, soit de 8823 R. P., soit d'aminotroazole, on recueille l'urine des rats traités et on fait des dilutions successives en milieu trypticase-sérum de Kupferberg [3]. Après ensemencement avec *T. vaginalis*, on détermine les concentrations de 8823 R. P. ou d'aminotroazole par comparaison avec des gammes contenant des quantités connues de ces produits.

Nous avons vu qu'en quarante-huit heures 13 p. 100 du 8823 R. P. passent dans l'urine du rat, alors que pour l'aminotroazole cette proportion n'est que de 0,2 p. 100.

ACTIVITÉ *in vitro* SUR LE BACILLE DE DÖDERLEIN. — On sait qu'il est avantageux qu'un trichomonacide respecte dans la flore vaginale normale les saprophytes utiles acidophiles dont l'espèce la plus représentative est le bacille de Döderlein.

Nous avons montré qu'en milieu à l'extrait de levure glucosé ce bacille peut se développer malgré une concentration de 1 p. 300 en 8823 R. P., alors que, par exemple, l'auréomycine l'inhibe déjà à 1 p. 300 000.

RÉSUMÉ. — Le 8823 R. P. est un produit très peu toxique pour la souris (DL<sub>50</sub> : 4,3 g/kg *per os*) et il est bien toléré par le rat et le chien au cours d'un traitement quotidien d'une durée d'un mois.

Le 8823 R. P. est très actif sur la trichomonose expérimentale sous-cutanée de la souris, puisqu'il préserve totalement ces animaux contre cette infection à la dose quotidienne de 0,012 g/kg *per os* administrée cinq jours de suite.

#### SUMMARY

ACTIVITY OF (HYDROXY-2' ETHYL)-1 METHYL-2 NITRO-5 IMIDAZOLE (8823 R. P.) IN EXPERIMENTAL *Trichomonas vaginalis* INFECTIONS.

8823 R. P. has a very low toxicity for mice (DL<sub>50</sub> = 4,3 g/kg *per os*). It is well tolerated by rats and dogs in the course of a daily treatment of one month's duration.

8823 R. P. has a high activity in experimental trichomonosis subcutaneously induced in mice: animals receiving a daily dosage of 0,012 g/kg *per os* during 5 days are totally protected.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] CUCKLER (A. C.), KUPFERBERG (A. B.) et MILLMAN (N.). *Antibiot. and Chemoth.*, 1955, **5**, 540.
- [2] DESPOIS (R.), PINNERT-SINDICO (S.), NINET (L.) et PREUD'HOMME (J.). *Giorn. Microbiol.*, 1956, **2**, 76.
- [3] KUPFERBERG (A. B.), JOHNSON (G.) et PRINCE (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **67**, 304.
- [4] LYNCH (J. E.), HOLLEY (E. C.) et MARGISON (J. E.). *Antibiot. and Chemoth.*, 1955, **5**, 508.
- [5] NAKAMURA (S.). *Pharm. Bull. Jap.*, 1955, **3**, 379.
- [6] SOREL (C.). *Presse méd.*, 1954, **62**, 602.

# RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS ALGOSTATIQUES DE LA 3-p-CHLOROPHÉNYL 1-1 DIMÉTHYL-URÉE (MONURON C.M.U.) EN MICROBIOLOGIE DU SOL

par G. RAUD, C. TYSSET et B. VACHER.

(Laboratoire de Biologie, Section Technique de l'Armée, Paris  
et Service de Microbiologie du Sol, Institut Pasteur)

Au cours de recherches [1] effectuées sur l'action de la 3-p-chlorophényl 1-1-diméthyl-urée sur les microorganismes du sol (bactéries et algues) nous avons été amenés à préciser l'action *in vitro* de cette substance sur *Stichococcus bacillaris* (Näg). Cette Chlorophycée de l'ordre des Ulotrichales est très fréquente dans le sol, elle se présente sous la forme de courts bâtonnets cylindriques de 10 à 15  $\mu$  de long sur 5  $\mu$  de large, arrondis aux extrémités, et se multiplie par cloisonnement transversal. La disposition filamenteuse qui en résulte ne permet jamais d'atteindre des filaments d'une grande longueur, car ceux-ci se dissocient rapidement. Chaque cellule ne possède qu'un seul chloroplaste sans pyrénoïde. Parmi les nombreuses espèces que nous avons pu isoler du sol, cette algue se révéla particulièrement sensible au Monuron, et d'autre part sa culture sur différents milieux organiques ou minéraux permet d'obtenir rapidement des colonies volumineuses, facilitant ainsi une étude *in vitro*. Pour cette même raison, Matruchot et Molliard [2] avaient utilisé cette espèce au cours de leurs études sur le métabolisme des algues. Leurs conclusions se rapprochent par certains points de celles que nous pourrions fournir.

A l'égard de *Stichococcus*, nous avons d'abord précisé le seuil de toxicité du Monuron dont les propriétés herbicides ont déjà suscité de nombreuses publications. Dans ce but des suspensions de ce corps, à des concentrations variables et maintenues homogènes par agitation entretenue, furent ajoutées à différents milieux de culture, tous préparés à partir de la solution minérale suivante préconisée par Lefèvre et coll. [3].

Nitrate de calcium .....	0,1 g
Phosphate bipotassique .....	0,04 g
Sulfate de magnésium .....	0,03 g
Nitrate de potassium .....	0,1 g
Perchlorure de fer .....	traces
Extrait de terre .....	7,5 ml
Eau .....	1 000 ml

Ce milieu était toujours gélosé à 10 p. 1 000 de façon à permettre une incorporation homogène du Monuron, produit quasiment insoluble dans l'eau. Un volume donné d'une solution titrée mélangée à 20 ml du milieu avant solidification, réalisée en boîte de Petri, évitait toute accumulation de la substance en un point quelconque de la plaque nutritive.

Chacune des boîtes futensemencée avec un volume constant d'une suspension de *Stichococcus* cultivés dans ce même milieu synthétique, mais en l'occurrence sans addition de gélose. Il fut alors possible de constater l'extrême sensibilité de cette algue au phytocide. Jusqu'à la concentration de  $10^{-5}$  de cette substance dans le milieu, aucune algue ne subsiste. Ceci dans un délai très court (vingt-quatre heures). A la concentration de  $10^{-6}$  les cellulesensemencées survivent mais ne prolifèrent pas. Ce n'est qu'à la concentration de  $10^{-7}$  que des colonies peuvent être observées. En constatant cette inhibition nous avons supposé qu'elle pourrait être atténuée, sinon supprimée, en utilisant les propriétés stimulantes de quelques substances organiques parmi celles que Matruchot et Molliard avaient étudiées. L'expérience consista alors à incorporer au milieu synthétique contenant du Monuron diverses substances glucidiques ou aminoacides à la concentration constante de 4 p. 1000.

Toutes les boîtes ainsi préparées furentensemencées avec un volume identique d'une culture en milieu liquide de *Stichococcus* et elles furent exposées à la lumière solaire à la température du laboratoire. Afin d'obtenir des cultures sans bactéries, les boîtes de Petri étaient additionnées d'antibiotiques aux doses suivantes : 20 unités de pénicilline et 40 de streptomycine par millilitre de milieu.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-joint, où la présence ou l'absence de colonies dans les différents milieux ainsi enrichis est exprimée par le signe + ou —.

	Milieu synthétique seul	Milieu synthétique + glucose	Milieu synthétique + lactose	Milieu synthétique + galactose	Milieu synthétique + maltose	Milieu synthétique + mannitol	Milieu synthétique + glycolle	Milieu synthétique + ac. glutamique
Concentration en Monuron $10^{-6}$	—	+	+	—	—	—	—	—
" $10^{-5}$	—	+	—	—	—	—	—	—
" $10^{-4}$	—	—	—	—	—	—	—	—
Absence de Monuron	+	+	+	+	+	+	+	+

Nous constatons que l'apport d'antibiotiques ne modifie nullement l'action du Monuron puisque les résultats obtenus en leur présence sont identiques à ceux de nos expériences préliminaires. De même les substances organiques ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur sur la croissance de *Stichococcus* ; les plaques ainsi enrichies, en l'absence de Monuron, permettent le développement normal de l'algue. Enfin seuls le glucose et le lactose permettent d'abaisser le seuil de toxicité. La première de ces substances est particulièrement active puisqu'en sa présence à une concentration en Monuron de  $10^{-5}$  la multiplication cellulaire de *Stichococcus* normalement inhibée se révèle néanmoins possible.

CONCLUSION. — Les propriétés algostatiques du Monuron que nous avons mises en évidence permettent de penser que l'action herbicide de ce produit s'accompagne d'un appauvrissement en carbone des terres ainsi traitées et consécutivement d'une modification du rapport C/N. On sait en effet que la flore algologique du sol contribue, grâce à la photosynthèse, à un enrichissement en carbone du sol et que son intervention dans la formation de l'humus est certainement importante. Par ailleurs, nous constatons que certaines substances glucidiques, et en particulier le glucose, sont capables de stimuler le développement de cette algue; ces résultats concordent avec ceux signalés par Molliard. Cette stimulation laisse supposer que l'activité toxique du Monuron, encore mal connue, pourrait agir entre autres sur le mécanisme de la photosynthèse à un stade qu'il conviendrait de préciser.

Les expériences décrites ne sont nullement écologiques, à la différence de celles réalisées dans un autre travail (H. de Barjac, C. Tysset et coll. [4]). On peut donc penser que, sous l'influence des phénomènes d'antagonisme et de synergie de la microflore du sol, les propriétés algostatiques du Monuron seraient différentes de celles que nous avons signalées *in vitro* et qu'en particulier les diverses substances hydrocarbonées de l'humus interviendraient d'une façon très variable dans le métabolisme de *Stichococcus bacillaris*.

RÉSUMÉ. — La (p-chlorophényl) 3 diméthyl 1,1 urée (CMU ou Monuron) a une action toxique, à la concentration de  $10^{-6}$ , sur une algue tellurique, *Stichococcus bacillaris* (Näg).

Si l'on ajoute au milieu nutritif du glucose ou du lactose à la concentration de 4 p. 1 000 le seuil de toxicité du Monuron se trouve abaissé.

Le Monuron, par ses propriétés algostatiques, a peut-être une influence secondaire sur le rapport C/N des sols traités par l'herbicide.

### SUMMARY

STUDIES ON ALGOSTATIC PROPERTIES OF 3-p-CLOROPHENYL 1-1 DIMETHYL-UREA (MONURON [CMU]) IN SOIL MICROBIOLOGY.

At a concentration of  $10^{-6}$  this compound has a toxic activity on a telluric alga, *Stichococcus bacillaris* (Näg).

Addition to the medium of glucose or lactose at a concentration of 4 p. 1 000 lowers the toxicity threshold of Monuron

The algostatic properties of Monuron might have a secondary influence on the ratio C/N of soils treated by this herbicide.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] TYSSET (C.), VACHER (B.) et MATHIEU (Cl.). *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, 1958, n° 72.
- [2] MATRUCHOT et MOLLIARD. *Rev. gén. Bot.*, 1902, **14**, 193.
- [3] LEFÈVRE, JAKOB (H.) et NISBET (M.). *Ann. St. Hydrobiol. appl.*, 1952, **4**, 5.
- [4] BARJAC (H. DE), TYSSET (C.), ROCHE (A.) et VACHER (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 88.



## COMPORTEMENT DU LAPIN ADULTE A L'INOCULATION DU VIRUS DE NEWCASTLE

par G. CIACCIO.

(*Laboratorio di Microbiologia e Chemioterapia*

[Direttore Prof. A. DI MARCO],

*Laboratori Scientifici Farmitalia, Milano)*

(présenté par P. GIROUD).

Poursuivant nos études sur le comportement du lapin adulte à l'inoculation avec divers virus (Col. SK, virus de la fièvre aphteuse), nous nous sommes adressé au virus de Newcastle.

Dans certaines conditions on a réussi à cultiver dans le poumon du lapin des rickettsies (vaccin Durand-Giroud 1940) et on a essayé, toujours sur poumon, la culture du virus de la grippe (Panthier, Cateigne et Hannoun, 1948). En outre, le lapin a, bien souvent, permis d'obtenir l'atténuation de divers virus.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — Nous avons employé des lapins adultes, mâles et femelles, de 1,800 kg à 2,600 kg. Les lapins étaient infectés par voie péritonéale, sous-cutanée, orale, intranasale, par instillation conjonctivale et dans la vaginale du testicule. Nous avons employé, le plus souvent, le liquide embryonnaire non dilué des embryons de poulet sur lesquels on avait cultivé le virus. Nous avons utilisé des doses de 4, 5 et 10 ml de matériel virulent. Dans une série d'essais plus restreinte, nous avons employé la même source de virus (liquide embryonnaire de poulet), mais aux dilutions de  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  sur un volume de 10 ml.

La souche que nous avons employée est entretenue dans notre laboratoire depuis 1953 ; elle a subi 120 passages sur œuf embryonné. Au cours des derniers passages on a observé une augmentation de son pouvoir infectant qui peut atteindre des titres de  $10^{-10}$  et de  $10^{-12}$ .

Pour détecter le virus dans le sang et dans les organes du lapin nous avons inoculé des embryons de poulet de 9 à 11 jours par voie chorio-allantoïdienne, avec une dose de 0,20 ml de chaque matériel.

**RÉSULTATS.** — 1° *Culture sur l'exsudat péritonéal.* — Le virus a été inoculé à la dose de 10 ml dans le péritoine du lapin quelques heures (trois à cinq heures) avant la préparation de l'animal pour la production de l'exsudat selon la méthode indiquée par Barski et coll. La récolte de l'exsudat a été faite vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures après l'inoculation du virus. La présence du virus a été révélée par l'infection des embryons de poulet et les cultures de tissus à partir des cellules de l'exsudat. Le virus a été détecté deux fois à vingt-quatre heures de l'inoculation et une fois à quarante-huit

heures de l'inoculation ; un quatrième lapin, sacrifié à soixante-douze heures, a été négatif.

2° *Diffusion du virus dans le sang.* — En prélevant le sang à l'oreille du lapin (1 ml par prise) et en l'inoculant (à la dose de 0,20 ml) aux embryons de poulet de 9 à 11 jours, on a recherché le virus. Plusieurs prises de sang ont été exécutées pour chaque lapin depuis les premiers instants jusqu'à plusieurs heures (sept, vingt-quatre, trente) et à plusieurs jours (deux à dix-huit) après l'inoculation. Le tableau I rapporte les résultats de divers essais.

TABLEAU I.

Nombre des lapins	Voie d'inoculation	Dose de virus	Virus dans le sang	Heures après inoculation
2	Orale	10 ml.	0	0
2	Conjonctivale	4 ml.	0	0
3	Intranasale	10 ml.	1/3	2 h.
5	Sous-cutanée	10 ml.	1/5	30 m.
13	Intrapéritonéale	10 ml.	11/13	15, 30, 45 m. 1 h., 1 h.30 2 h., 3 h., 3 h.30, 4 h. 4 h. 15.

m : minutes après l'inoculation ; h. : heures après l'inoculation.

On a donc pu détecter le virus de Newcastle dans le sang du lapin très précocement (de quinze minutes à quatre heures quinze) après l'inoculation. Dans deux cas seulement on a observé la diffusion du virus dans le sang après inoculation par d'autres voies (1 cas d'injection sous-cutanée et 1 cas d'instillation intranasale) que la voie intrapéritonéale. Celle-ci nous a donné les résultats les plus constants ; le virus a été décelé au cours d'une seule prise de sang (1/17, 1/14), tandis que chez les 9 autres lapins plusieurs prises de sang (4/17, 6/17, 3/10, 5/10, 4/15, 7/15, 5/5, 4/5, 4/5) ont permis le réisolement du virus. Il n'y a pas eu de régularité absolue dans les temps qui ont permis l'isolement du virus : les prises de sang qui ont mis en évidence le virus suivent ou précèdent celles qui ont abouti à un résultat négatif. Nous n'avons pas réussi à isoler le virus au-delà de certaines périodes (trois à quatre heures), quoique les prises de sang aient été poursuivies sur les animaux pendant plusieurs heures (sept) et divers jours (un, six, dix-huit), car toutes ces prises de sang ont été négatives.

3° *Persistence du virus au siège d'inoculation.* — Après avoir examiné la diffusion du virus dans le sang, il nous a paru intéressant d'étudier sa persistance au siège d'inoculation. Dans le tableau II sont rapportés les résultats obtenus.

Au-delà de quarante-huit heures nous n'avons jamais réussi à réisoler le virus de l'exsudat péritonéal (1 cas à soixante-douze heures) et du poumon (9 lapins sacrifiés à soixante-douze, quatre-vingt-seize, cent vingt, cent quarante-quatre heures et neuf, quatorze, vingt, vingt-quatre jours). Un seul lapin (1 cas) sacrifié à vingt-quatre heures a été négatif. Cet animal, avant de recevoir le virus (10 ml) par voie intranasale, avait été traité par la même voie avec 2 ml de sérum de lapin normal ; ce traitement a été exécuté deux heures avant l'inoculation du virus.

TABLEAU II.

Voie d'inoculation	Lap. pos.	Heures après l'inoculation	Lap. nég.	Heures après l'inoculation	Tissus et organes
Intrapéritonéale	3	24-48	1	72	Exsudat péritonéal
Vaginale du testicule	2	24	-	-	Vaginale du testicule
Intranasale	12	24-48	10	24, 72 96, 120 144, 9-24 j.	Poumons Cornets

j. : jours ; lap. : lapin ; pos. : positif ; nég. : négatif.

4° *Essai de passage lapin-lapin.* — Les cinq séries d'essais, poursuivis sur 28 lapins, ont été négatives en inoculant le virus réisolé (au premier passage embryon de poulet-lapin), soit par voie péritonéale, soit par voie intranasale. Le prétraitement des lapins par le zymosan (20 à 30 mg par voie intrapéritonéale une heure avant l'inoculation de broyats de tissu) et par la cortisone (acétate Merck, 280-550 mg par voie sous-cutanée en doses variables au cours de cinq à six jours de traitement) n'a pas favorisé la culture du virus. Le comportement du lapin, en particulier dans le cas de l'inoculation intranasale, évoque les constatations de Ginsberg (1951) chez la souris à la suite de l'inoculation par voie intranasale de certaines souches de virus de Newcastle.

CONCLUSIONS. — 1° Aucun symptôme de maladie n'a été décelé chez les lapins dans le cas d'une observation prolongée pendant plusieurs jours. Très rarement, chez quelques animaux, on a remarqué une température supérieure à 40° C pendant quelques jours ; cela sans aucune régularité ni aucune fixité. Nous n'avons jamais pris la température dans les premières heures après l'inoculation du virus et nous n'avons donc aucun renseignement à ce sujet.

2° Le virus peut être décelé dans le sang peu de temps après l'inoculation. L'injection intrapéritonéale a donné les résultats les plus constants : le virus a été réisolé du sang entre quinze minutes et quatre heures quinze.

3° Le virus peut persister pendant quelques heures (vingt-quatre à quarante-huit) sur les cellules des tissus (exsudat péritonéal) et des organes (poumon, voies respiratoires, vaginale du testicule), sièges de

l'inoculation. Au delà de cette période restreinte (vingt-quatre à quarante-huit heures) le virus n'a jamais été réisolé.

4° Les essais de passage lapin-lapin n'ont pas permis la culture du virus. Celui-ci, réisolé sur les lapins qui ont reçu le matériel virulent de l'embryon de poulet, n'a jamais été reconnu aux passages successifs lapin-lapin.

5° Les résultats obtenus à propos de la diffusion rapide du virus et au sujet de sa persistance au siège d'inoculation révèlent certaines conditions qui permettent de suivre le virus de Newcastle chez un animal non sensible à cet agent.

## SUMMARY

### COMPORTMENT OF ADULT RABBITS INOCULATED WITH NEWCASTLE DISEASE VIRUS.

1. Rabbits inoculated with NVD do not manifest any pathological symptoms.

2. The virus can be demonstrated in the blood soon after inoculation. The intraperitoneal route yields the most reliable results.

3. The virus can persist a few hours (24 to 48) at the site of inoculation (peritoneal exudate cells, lungs, respiratory tract, testis).

4. It has not been possible to realize passages from rabbit to rabbit.

5. The findings show that NVD can be studied on an animal not sensitive to this virus.

## BIBLIOGRAPHIE

- GINSBERG (H. S.). *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 191.  
 WAGNER (R. R.), BENNETT (I. L. Jr) et LEQUIRE (V. S.). *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 321.  
 BENNETT (I. L. Jr), WAGNER (R. R.) et LEQUIRE (V. S.). *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 335.  
 CIACCIO (G.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1957, **50**, 249.  
 CIACCIO (G.). *Revue Immunol.*, 1957, **21**, 285.  
 ATKINS (R.) et WEI CHANG HUANG. *J. exp. Med.*, 1958, **107**, 383, 403 et 415.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

**Etude d'une souche d'*Achromobacter* : *Achromobacter stereotropis***, par J. BRISOU, C. TYSSET et B. VACHER.

**Le virus de l'avortement des ovins. Sensibilité à quelques antibiotiques**, par F. ROGER et A. ROGER.

**Contribution à l'étude de *Geotrichum* et *Trichosporum* d'origine humaine**, par M. VIEU et G. SEGRETAINE.

**Deux cas de déséquilibre biologique en sols du Niger**, par H. DE BARJAC et A. ROCHE.

**L'action des phosphates insolubles sur les groupes microbiens telluriques**, par A. ROCHE.

**Résistance à l'hémolyse des hématies par adjonction d'antibiotiques**, par R. SEIGNEURIN, C. TYSSET et B. VACHER.

---

## LIVRES REÇUS

*Ciba Foundation Colloquia on ageing*. Vol. IV. J. et A. Churchill, édit. Londres, 1958. Prix : 45 shillings.

Ce volume représente le IV<sup>e</sup> Colloque de la Ciba Foundation, concernant le vieillissement. Il concerne spécialement le problème du métabolisme de l'eau et des électrolytes. Il est rédigé suivant les habitudes de la Fondation Ciba et présente un grand intérêt, autant pour les spécialistes que pour celui qui veut rapidement se faire une opinion sur l'état de la question. Sont ainsi envisagés : la sécrétion des électrolytes, l'action des glandes endocrines, l'effet des différentes protéines et l'absorption des minéraux, le contrôle génétique du métabolisme érythrocytaire, le développement du contrôle de l'équilibre acido-basique, le rôle du rein, la tolérance au stress provoqué par les déséquilibres électrolytiques, les troubles cardiaques consécutifs à la rétention d'eau et des sels, enfin l'individualisation d'un nouveau syndrome constitué par la carence du magnésium.

Comme tous les volumes de cette collection, ce volume aura un succès mérité.

A. E.

**H. M. Sinclair.** — *Essential Fatty Acids*. 1 vol., 268 p. Butterworths Scientific Publications, London, 1958. Prix : 50 shillings.

Ce volume est le compte rendu de la IV<sup>e</sup> Conférence internationale sur les problèmes biochimiques des lipides, conférence qui a eu lieu à Oxford (G.-B.) en juillet 1957. Les 34 exposés sont groupés sous trois rubriques : aspects chimiques, absorption et distribution, fonctions biochimiques.

Dans la partie chimique sont traités les difficiles problèmes de l'analyse des acides gras non saturés : séparation et structure. La chromatographie en milieu gaz-liquide, la spectrographie d'absorption dans l'infra-rouge et l'ultra-violet, l'étude des produits de l'oxydation chimique ou par voie enzymatique permettent de débrouiller lentement ces mélanges complexes de produits labiles et très voisins pouvant posséder cependant des propriétés biologiques très différentes.

Dans la partie biochimique, ce n'est pas l'aspect « essentiel » des acides gras qui est envisagé, mais diverses propriétés biologiques des acides gras classés comme essentiels ou d'acides chimiquement



voisins. Ceci a amené quelques confusions rectifiées par la discussion générale de Sinclair qui a exposé l'ensemble de ces propriétés biologiques dont les effets s'intriquent. La majeure partie des exposés et des discussions est consacrée au problème d'actualité : rapports entre les acides gras non saturés, le métabolisme du cholestérol et les maladies vasculaires, artériosclérose et thrombose coronaire. L'existence de ces relations est confirmée d'une manière indéniable, mais les opinions sont partagées lorsqu'on cherche à préciser le mécanisme de ces interactions : pour les uns, l'acide linoléique, ou d'autres acides apparentés, intervient dans le mécanisme de synthèse du cholestérol, pour les autres, il joue un rôle dans l'élimination de ce composé ; tous les auteurs ne sont pas convaincus que le cholestérol sanguin est « mauvais » en lui-même et que l'administration aux malades de certaines huiles qui provoquent une baisse de la cholestérolémie, constitue, de ce fait, une thérapeutique efficace. Le problème est certainement plus complexe qu'on ne l'avait supposé lors des premières observations.

La publication des discussions suivant chaque exposé et des huit discussions générales qui servent de conclusion à cette conférence est particulièrement instructive. Elle permet au lecteur qui n'a pas assisté à cette réunion de bénéficier de ces échanges de vue si féconds, en lui faisant connaître ce qui a été dit et que souvent on n'imprime pas.

M. F.

M. J. Pelczar Jr. et R. D. Reid. — *Microbiology*. 1 vol., 564 p. McGraw-Hill Book Company éd., New-York, Toronto, London, 1958. Prix : 62 shillings.

Ce livre, destiné aux étudiants, leur expose de façon très didactique les principaux problèmes de la microbiologie. Il constitue une excellente introduction à l'étude de cette science à laquelle les auteurs essaient d'intéresser les élèves en leur donnant le désir d'approfondir les notions de base exposées dans ce livre. La microbiologie y est envisagée dans son ensemble et les têtes de chapitres sont :

1° Généralités sur la vie microbienne et historique ; 2° Caractéristiques des bactéries comme prototypes de tous les microorganismes (nomenclature, morphologie, reproduction et croissance, enzymes, modifications, mutations et génétique...) ; 3° Les caractéristiques et l'importance des microorganismes autres que les bactéries (champignons, levures, virus, rickettsies, protozoaires, algues) ; 4° Le contrôle des microorganismes (agents physiques, chimiques, antibiotiques...) ; 5° Microorganismes et maladies ; 6° Microbiologie appliquée (eau, air, lait, aliments, sol, microbiologie industrielle...).

De nombreux graphiques et d'excellentes photographies rendent la lecture de ce livre attrayante. Chaque chapitre est complété par quelques références cruciales et par des questions auxquelles il est demandé à l'étudiant de réfléchir. Ce livre de 564 pages, dont la présentation est excellente, comporte un glossaire des termes bactériologiques.

L. L.

**R. R. Race et R. Sanger.** — *Blood groups in man*, 3<sup>e</sup> édition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1958. Prix : 42 shillings.

Depuis la deuxième édition de cet ouvrage en 1954, de nombreuses découvertes sont venues enrichir et compliquer le domaine des groupes sanguins, à tel point que même les spécialistes ne peuvent être au courant de tous ces phénomènes et seuls quelques-uns peuvent reconnaître l'importance de chacun des antigènes ou particularités signalées. En gardant le plan primitif de l'ouvrage, mais en éliminant un certain nombre de données anciennes, les auteurs ont pu incorporer toutes les acquisitions récentes, tout en gardant à l'ouvrage toute sa clarté. Il y est très aisé pour le lecteur de se retrouver dans le dédale des différents systèmes antigéniques, dont l'un des plus compliqués semble être le système ABO et le système sécréteur, avec les antigènes X et x, y et les différentes variantes, ainsi que de nombreux antigènes récemment découverts Mc, Ms, S<sup>4</sup>, y et G.

Le chapitre d'identification des anticorps, l'étude des problèmes de filiation ou des rapports entre groupes sanguins et maladies, a pris une importance notable, ainsi que l'étude des relations entre groupes sanguins et d'autres caractères génétiquement déterminés.

Il est superflu de dire que cet ouvrage est indispensable à tous ceux qui s'occupent des problèmes concernant les groupes sanguins.

A. E.

**Norman F. Morris et J. C. McClure Browne.** — *A Symposium on non-toxaemic hypertension in pregnancy*. J. et A. Churchill, édit., Londres, 1958. Prix : 35 shillings.

Le problème de l'hypertension, au cours de la grossesse, a été l'objet d'interprétations divergentes. C'est pourquoi un certain nombre de spécialistes ont été réunis en un Colloque à l'Institut d'Obstétrique et de Gynécologie, à Londres, en juillet 1957. Chacun des aspects des relations entre l'hypertension et la gestation a été l'objet d'une discussion extrêmement concise ; ainsi l'aspect génétique, l'état fonctionnel des artérioles, les lésions précoces, le retentissement sur l'évolution de la grossesse, les décisions thérapeutiques à prendre et le pronostic lointain ont été discutés. Cette mise au point montre que de nombreux problèmes sont encore en suspens.

A. E.

*Lectures on the scientific basis of medicine*, Vol. VI, 1956-1957, University of London, The Athlone Press, 1958. Prix : 45 shillings.

Ce sixième volume contient 21 conférences organisées par la Fédération Britannique d'Enseignement Médical post-universitaire pendant l'année 1956-1957. Elles permettent aux lecteurs de se faire une opinion sur l'état des recherches dans différents domaines. Chacune de ces conférences a été effectuée par un spécialiste de la question. Parmi les sujets qui intéressent les microbiologistes et les immunologistes, citons : la transplantation d'organes (Demster), l'usage des matières plastiques dans la chirurgie vasculaire, le principe des appareils cœur-poumons, la poliomyélite, la résistance des staphylocoques aux anti-

biotiques, le rôle du système endocrinien dans le cancer du poumon, la synthèse et la dégradation des polysides, le métabolisme de l'acétylcholine dans le système nerveux, le microscope électronique en virologie.

Ainsi, chacune de ces conférences donne un aperçu très précieux de l'évolution des différents chapitres traités.

A. E.

**N. Ogata.** — *Rickettsia Tsutsugamushi*, 167 pages.

Cet ouvrage comprend trois parties, la première est constituée par cinq planches représentant les principaux faits concernant cette rickettsiose, découverte par l'auteur, ainsi qu'un résumé en langue allemande. La deuxième partie, une centaine de pages, est en langue japonaise. La troisième partie, de 56 pages, représente la bibliographie sur cette question.

Dans le résumé en langue allemande, l'auteur donne quelques précisions sur sa technique de recherche notamment par inoculation du prélèvement dans le testicule du lapin qui réalise par passages successifs une augmentation de la virulence. L'affection est actuellement facile à traiter par les antibiotiques : auréomycine, terramycine, chloromycétine, mais le malade ainsi traité est sensible à la réinfection, alors que celui qui a guéri naturellement reste immunisé pendant une dizaine d'années.

A. E.

**L. Young et G. A. Maw.** — *The metabolism of sulphur compounds*. Methuen et C<sup>o</sup>, édit., Londres, et J. Wiley and Sons, Inc., New-York, 1958, 180 pages. Prix : 16 shillings.

Ce petit ouvrage concerne le métabolisme des divers composés soufrés organiques et minéraux chez les animaux supérieurs et les microorganismes. Les auteurs passent en revue les dérivés thiols et disulfures, les thioéthers, les composés sulfonium, les sulfoxydes et les sulfones, ainsi que les acides sulfoniques et les esters d'acide sulfurique ; les composés minéraux sont également traités succinctement. Les composés tels que la cystéine et la cystine, l'homocystéine, la méthionine, le glutathion et la taurine sont traités avec plus de détails.

L'ouvrage se termine par un chapitre relatif au métabolisme des dérivés soufrés par les microorganismes ; quelques pages sont réservées aux bactéries autotrophes qui utilisent les composés soufrés comme source d'énergie.

F. B.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

2024-01-16

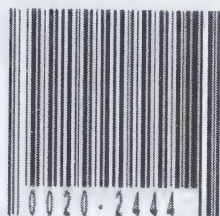
**Box:** IA40541118  
**Old Pallet:** IA405411



N° 3

Annales de l'Institut  
Pasteur 1959-03: Vol 96 Iss  
3

INTERNET ARCHIVE



UR

CHAROSE,

CONSIDÉRE  
JCRE

uline).

(Institut de Médecine Tropicale de Lisbonne)

Il y a bien longtemps, en 1917, j'ai décrit dans le *British medical Journal* (29 décembre), avec la collaboration du D<sup>r</sup> Frank E. Taylor, une série de méthodes microbiologiques pour la recherche et l'identification d'un assez grand nombre de sucres et autres glucides Fehling-réducteurs ou non Fehling-réducteurs. Jusqu'à cette époque, le glucose était la seule substance pour l'identification de laquelle on employait une méthode mycologique : la fermentation par la levure de boulanger (levure de bière) était considérée comme spécifique pour ce sucre. Il est intéressant de noter que cette opinion, bien qu'erronée, se trouve encore dans plusieurs ouvrages modernes de biochimie médicale. La levure de boulanger, en effet, fait fermenter non seulement le glucose, mais encore constamment le lévulose et le mannose,

(\*) Manuscrit reçu le 15 octobre 1958.

presque constamment le maltose, souvent le galactose et le saccharose, et occasionnellement le lactose.

Récemment, un biochimiste bien connu m'a conseillé de reprendre l'étude du sujet dans le but de rendre moins laborieuses et plus pratiques mes anciennes méthodes.

S'il est vrai que la chromatographie, si simple, a rendu inutiles beaucoup de mes anciens procédés, il ne faut pas oublier cependant que, comme l'a écrit si justement Anne-Marie Staub, l'identification définitive d'un sucre ne peut pas se faire sur la seule valeur d'un  $R_F$ , ou par l'utilisation des révélateurs.

Dans la présente note, je me limiterai à traiter brièvement de la détermination mycologique du saccharose, glucide non réducteur. J'emploie le terme mycologique *sensu lato* pour indiquer non seulement l'emploi des champignons, mais encore celui des bactéries.

#### MÉTHODE RECOMMANDÉE.

La méthode la plus simple et la plus pratique est la suivante (il s'agit en réalité d'une méthode chimico-mycologique) :

La substance à déterminer, en solution, est éprouvée avec le Fehling ou le Benedict. Si la réaction est positive, la substance ne peut pas être du saccharose puisque ce sucre est non réducteur, et il est alors inutile de continuer l'investigation. Si la substance est non réductrice, on en prépare une solution à 1 p. 100 dans de l'eau peptonée comme on en trouve dans tous les laboratoires de bactériologie (n'employer jamais du bouillon de viande qui peut contenir des traces de glucose). La solution, après stérilisation (une ébullition d'une demi-minute est suffisante en pratique et n'altère pas la structure des glucides usuels) est placée dans un saccharimètre stérilisé ou dans un simple tube de verre stérile, contenant de préférence un petit tube de Durham pour capter le gaz. On ensemence avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre, ou le tube, est placé à l'étuve à 35°-37° C. S'il y a fermentation, on peut conclure que la substance est très probablement du saccharose. Pourquoi ? L'explication se lit facilement sur le tableau des propriétés fermentaires des champignons et bactéries employés dans mes méthodes.

Parmi les très nombreuses substances étudiées : glucides, alcools, etc. (les substances mentionnées sur le tableau ne représentent qu'une fraction d'entre elles), seuls le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose fermentent avec formation de gaz sous l'influence de *C. tropicalis* souche A. Une substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être ou du glucose, ou du lévulose, ou du mannose, ou du maltose, ou du galactose ou du saccharose. Mais si elle avait été



TABLEAU I. — Action fermentaire sur les glucides et autres substances de quelques champignons et bactéries.

	Glucose	Lévulose	Mannose	Maltose	Galactose	Lactose	Arabinose	Rhamnose	Xylose	Saccharose	Inuline	Raffinose	Dextrine	Amidon	Glycérol	Erythritol	Adonitol	Dulcitol	Mannitol	Sorbitol	Salicine	Amygdaline	Inositol	Créatine Ac. urique Glycuronates	Ac. salicylurique Ac. homogénétique
<i>Candida krusei</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida albicans</i> (Robin) var. <i>pinoyi</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida albicans</i> (Robin) var. <i>metalandinensis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida tropicalis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida pseudotropicalis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida macedoniensis</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida guilliermondii</i> (Cast.) (Souche A)	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Proteus morgani</i> (Cast. & Chalm.) (Souche A)	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Salmonella schottmuelleri</i> (Winslow & al.) (Souche M)	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	
<i>Escherichia coli</i> (Migula) var. <i>communis</i> (Auctores) (Souche C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	
<i>Escherichia coli</i> (Migula) var. <i>communior</i> (Auctores) (Souche Q)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	

+ = Fermentation avec production de gaz. 0 = Absence de fermentation (il n'est tenu aucun compte d'une simple acidité).

du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose, du galactose, elle aurait réduit le Fehling et le Benedict. Il ne reste pratiquement qu'une seule possibilité : il s'agit de saccharose. Ce raisonnement peut être résumé par la formule mycologique, ou plus exactement chimico-mycologique, suivante :

Saccharose :

Fehling, Benedict .....	0
<i>Candida tropicalis</i> .....	+

En employant des saccharimètres gradués, on peut développer des méthodes quantitatives.

#### MÉTHODE STRICTEMENT MYCOLOGIQUE.

La méthode que j'ai recommandée est en réalité une méthode chimico-mycologique. S'il l'on désire avoir recours à des méthodes mycologiques *sensu stricto* il y en a plusieurs. J'en mentionnerai deux.

1° Une solution à 1 p. 100 de la substance à déterminer est préparée en eau peptonée et après stérilisation (ébullition d'une demi-minute) est distribuée en deux saccharimètres, ou deux tubes, contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n° 1 estensemencé avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre ou le tube n° 2 avec *Salmonella schottmuelleri*. On les place à l'étuve à 35-37° C. S'il y a fermentation avec *C. tropicalis* et pas de fermentation avec *S. schottmuelleri*, on peut conclure que selon toute probabilité, il s'agit de saccharose. On en trouve l'explication sur le tableau des fermentations.

*Candida tropicalis* produit une fermentation gazeuse seulement dans le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose. Notre substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être l'un de ces six glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose ou du galactose, elle aurait été fermentée aussi par *S. schottmuelleri*. Il reste donc une seule possibilité : ce doit être du saccharose.

Saccharose :

<i>Candida tropicalis</i> .....	+
<i>Salmonella schottmuelleri</i> .....	0

2° Une portion de la solution de la substance estensemencée avec *Escherichia coli* var. *communior* (souche Q) et une autre portion avec *Escherichia coli* var. *communis* (souche C). S'il y a fermentation avec *communior* et non avec *communis*, il s'agit de saccharose. La raison en est que les deux souches attaquent

les mêmes substances à l'exception du saccharose, qui est fermenté par *communior* (souche Q) et non par *communis* (souche C).

Saccharose :

<i>Escherichia coli communior</i> (souche Q) .....	+
<i>Escherichia coli communis</i> (souche C) .....	0

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DU SACCHAROSE DANS UN MÉLANGE  
CONTENANT UN OU PLUSIEURS SUCRES RÉDUCTEURS SUIVANTS :  
GLUCOSE, LÉVULOSE, MANNOSE, MALTOSE, GALACTOSE.

La solution du mélange (elle est Fehling et Benedict positive) est inoculée avec *Escherichia coli communis* (souche C), qui ne touche pas le saccharose tandis qu'elle fermente les sucres réducteurs mentionnés (et de nombreuses autres substances). Si après épuisement complet par cette souche le liquide est fermentescible par *Candida tropicalis*, on peut conclure que le mélange contenait du saccharose.

*Explication.* — Le liquide ayant été épuisé complètement par *Escherichia coli* var. *communis* ne contiendra plus aucun des sucres réducteur mentionnés, et il sera Fehling et Benedict négatif. Si ce liquide est capable d'être fermenté par *Candida tropicalis*, cela indique la présence de saccharose puisque, en pratique, le saccharose est la seule substance fermentescible par *Candida tropicalis* à part le glucose, lévulose, mannose, maltose, galactose (voir tableau des fermentations).

#### CONCLUSION.

Le saccharose peut être facilement déterminé par des méthodes mycologiques. Le procédé le plus simple, si l'on sait au préalable que la substance à identifier est non réductrice, est l'emploi du champignon *Candida tropicalis* (souche A). En pratique, toute substance non réductrice capable d'être fermentée par *Candida tropicalis* est du saccharose, autrement dit le champignon *Candida tropicalis* est spécifique pour le saccharose, parmi les substances non réductrices.

#### SUMMARY

MYCOLOGIC DETECTION AND IDENTIFICATION OF SACCHAROSE,  
A NON-REDUCING GLUCIDE.

A FUNGUS (*Candida tropicalis* CASTELLANI) WHICH CAN BE CONSIDERED  
SPECIFIC FOR THE DETERMINATION OF THIS GLUCIDE  
IF THE SUBSTANCE TO BE DETERMINED IS NON-REDUCING.

Saccharose can easily be identified by means of mycological methods. When the substance to identify is known to be non-reducing, the simplest technique is to use *Candida tropicalis* Cas-

tellani (strain A). Practically, any non-reducing substance which can be fermentated by *Candida tropicalis* is saccharose, or, in other words, *Candida tropicalis* has a specific fermentative activity toward saccharose, among the non-reducing substances.

★ ★

Je serai heureux d'envoyer des cultures de *Candida tropicalis* (souche A) et des autres champignons et bactéries, mentionnés dans le tableau, aux travailleurs de laboratoire qui le désireraient.

#### BIBLIOGRAPHIE

CASTELLANI (A.) et TAYLOR (F. E.). *Brit med. J.*, 1917, **2**, 855.

CASTELLANI (A.). *Commentationes Pontificia Academia Scientiarum*, 1955, **47**, 37.

STAUB (A. M.). *Techniques de laboratoire*, p. 792, Masson et C<sup>ie</sup>, édit. Paris 1954.

#### ADDENDUM

##### IDENTIFICATION MYCOLOGIQUE DE L'INULINE.

Il sera peut-être opportun de dire quelques mots sur la détermination mycologique d'une autre substance non réductrice, l'inuline, son emploi dans le « Clearance Test » pour mesurer la filtration glomérulaire ayant provoqué un vif intérêt.

Dans le *Journal of Biochemistry* (1922, **46**, 655-658) j'ai publié, avec le D<sup>r</sup> F. E. Taylor, plusieurs méthodes mycologiques et chimico-mycologiques mises au point par moi pour l'identification de cette substance. Récemment, je les ai modifiées et simplifiées. Je me bornerai à décrire brièvement l'une d'elles, strictement mycologique, et la plus simple.

On fait une solution à 1 p. 100 dans de l'eau peptonée de la substance à déterminer et, après stérilisation (ébullition une demi-minute), on la répartit dans deux saccharimètres ou deux tubes stérilisés contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n° 1 estensemencé avec *Candida macedoniensis* (souche A), et le saccharimètre ou tube n° 2, avec *Candida tropicalis* (souche A). On les place à l'étuve à 35°-37°. S'il y a fermentation avec production de gaz avec *C. macedoniensis* et non avec *C. tropicalis*, on peut conclure que, selon toute probabilité, il s'agit de l'inuline. L'explication se lit facilement sur le tableau des fermentations. *C. macedoniensis* provoque la fermentation gazeuse des glucose, lévulose, mannose, galactose, saccharose et inuline seulement. Notre substance ayant été fermentée par ce

champignon doit donc être l'un de ces glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du galactose ou du saccharose, elle aurait été fermentée aussi par *C. tropicalis*. Il reste une seule possibilité : ce doit être de l'inuline.

Inuline :

<i>Candida macedoniensis</i> .....	+
<i>Candida tropicalis</i> .....	0

*Identification de l'inuline dans un mélange contenant une ou plusieurs des substances suivantes : glucose, lévulose, mannose, maltose, galactose, lactose, arabinose, rhamnose, xylose, saccharose, raffinose, glycérol, dulcitol, mannitol, sorbitol, salicine.* — Le mélange en solution est inoculé, suivant la technique déjà décrite, avec *Escherichia coli* var. *communior* souche Q. Si, après épuisement par cette bactérie, le liquide est encore fermentescible par *C. macedoniensis*, on peut conclure que le mélange contenait de l'inuline. L'explication est donnée par le tableau des fermentations. Naturellement il faut prendre la précaution d'employer des souches d'*E. coli* var. *communior* et de *C. macedoniensis* qui ont à peu près le même pouvoir fermentaire.

*Inulinurie.* — L'inulinurie spontanée n'existe pas, mais quand on fait un « Inulin Clearance Test », l'inuline apparaît dans l'urine. Si l'urine est fermentescible par *C. macedoniensis* et non fermentescible par *C. tropicalis*, ceci indique la présence d'inuline.

*Technique :* 16 cm<sup>3</sup> d'urine sont placés dans un tube ; il est avantageux d'y ajouter 4 à 8 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée pour faciliter le développement des microorganismes. Après ébullition d'une demi-minute on répartit le liquide dans deux saccharimètres ou deux tubes avec petit tube de Durham. Le saccharimètre ou tube n° 1 estensemencé avec *C. macedoniensis*, le saccharimètre ou tube n° 2, avec *C. tropicalis*. On les place à l'étuve à 35°-37°. S'il se produit une fermentation avec gaz dans le tube n° 1 et pas de fermentation dans le tube n° 2, on peut conclure que, selon toute probabilité, l'urine contenait de l'inuline. En employant des saccharimètres gradués, on peut mettre au point des méthodes quantitatives.

**CONCLUSION.** — En pratique, on peut affirmer que toute substance fermentescible par *C. macedoniensis* et non par *C. tropicalis* est de l'inuline.

---

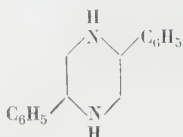


# DONNÉES EXPÉRIMENTALES SUR LA PHÉNYRACILLINE ET SON ASSOCIATION AVEC LA DIHYDROSTREPTOMYCINE

par A. LUTZ (\*).

(Laboratoire Départemental de Bactériologie, Strasbourg  
[Directeur : D<sup>r</sup> A. LUTZ])

Ce travail expérimental a pour but de rechercher, d'une part, la place du dipénicillinate de 2,5-diphénylpipérazine ou phényracilline



2,5-diphénylpipérazine

dans le groupe des pénicillines-retard où elle a été rangée par Nominé et ses collaborateurs [1] et, d'autre part, l'intérêt de son association avec la dihydrostreptomycine.

## MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.

Nos expériences ont été faites sur des chiens d'une même famille pesant entre 24 et 26 kg. Les titrages des pénicillinémies ont été effectués d'après la méthode de diffusion de Penau et collaborateurs [2]. Les lectures, facilitées par l'utilisation de chlorhydrate de 2-3 triphényl tétrazolium, réactif utilisé par Pratt et Dufrenoy [3] dans l'étude cytochimique de la méthode de Heatley, ont été faites avec un imagiscope.

Pour les dosages de la dihydrostreptomycine nous avons utilisé la méthode des dilutions de Sureau et Chabbert [4], que nous avons modifiée en tenant compte du facteur sérum de chien dans la gamme témoin dans chaque cas. Les taux bactériostatiques de la souche de staphylocoques d'Oxford, utilisée dans nos titrages, ont été recherchés après ensemencements identiques ; ils sont de 0,004 µg/ml pour la pénicilline et 0,15 µg/ml pour la dihydrostreptomycine (lecture faite après dix-huit heures à 37°).

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

## RÉSULTATS.

1° Dans une première partie de ce travail nous avons recherché les taux de pénicillémie après injection de phényracilline, comparativement à ceux obtenus après administration de pénicillinate de sodium et de dipénicillinate de N N' dibenzyléthylènediamine ou benzathine pénicilline.

Dans tous les cas ces produits ont été administrés aux chiens par voie intramusculaire à raison de 300 000 unités dans 3 ml de soluté chloruré isotonique à 9 p. 1 000.

Notons que les injections de la phényracilline ont été très bien tolérées.

Voici les pénicillémies observées en U. O. par millilitre de sérum jusqu'à soixante-douze heures après l'injection (tableau I).

TABLEAU I. — Heures de prélèvement après l'injection. Taux en U. Oxford au cours du temps.

Sel injecté		½ H.	1 H.	2 H.	3 H.	4 H.	5 H.	6 H.	8 H.	10 H.	15 H.	24 H.	33 H.	48 H.	72 H.
Sel de sodium		12	0,75	1,4		0,95		0,31	0,07		indé- sable				
Sel de 2-5 diphényl- pipérazine	Chien I	0,96	0,98	0,97		0,71			0,5	0,5	0,36	0,15	0,07	0,03	0,025
	Chien II	0,95	1	1		0,72			0,63	0,4		0,14	0,11	0,08	0,05
	Chien III		0,96	0,82	0,68			0,53	0,44	0,39		0,13		0,05	
	Chien IV	1	1	0,92	0,73			0,6	0,51	0,4	non titré				
Sel de N.N' dibenzyléthyl- ène diamine	I		0,33	0,22	0,22		0,25		0,31	0,31		0,18		0,16	
	II		0,26	0,23	0,24		0,26		0,28	0,30		0,14		0,12	

Ce tableau met en évidence les faits suivants :

a) L'examen des taux de pénicilline obtenus après injection de quantités égales de pénicillinate de sodium d'une part et de sel 2-5 diphénylpipérazine de la pénicilline G, montre que ce dernier corps représente bien une forme retard ;

b) Cette nouvelle forme retard donne des taux de pénicilline significatifs jusqu'à soixante-douze heures après l'injection.

c) Elle permet de maintenir, pendant les vingt-quatre premières heures après son injection, des concentrations sanguines relativement élevées et en particulier très supérieures à celles obtenues après injection d'une quantité équivalente de pénicilline active, de son sel de N N'-dibenzyléthylène diamine ou benzathine pénicilline.

Les courbes ci-jointes mettent en évidence ces données.

Notons par ailleurs que cette supériorité a été retrouvée également par rapport au pénicillinate de procaine par Csermely [5], Nominé [4], Marson [6] et Beerens [7] et leurs collaborateurs.

2° Sur l'association : phényracilline-dihydrostreptomycine. — Dans la deuxième partie de ce travail nous avons recherché

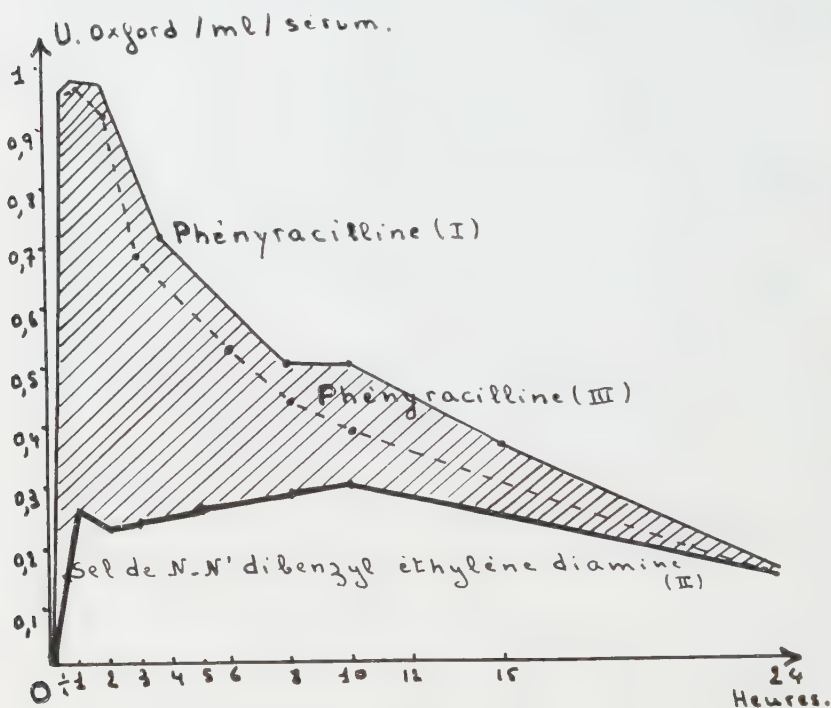


FIG. I.

TABLEAU II.

STREPTOMYCINÉMIES en $\mu\text{g/ml}$ sérum								
	$\frac{1}{2}$ H.	1 H.	2 H.	3 H.	4 H.	6 H.	8 H.	10 H.
Chien I	16,6	16,6	12,1		4,95	1,45	0,88	0,25
Chien II	23,3	16,6	13		6,9	2,5	0,84	0,3
Chien III		16,6	11		6,04	1,8	0,62	0,37
Chien IV		16,6	13	8	4,5	1,04	0,56	0,2

l'action bactéricide de l'association phényracilline-dihydrostreptomycine, par rapport à chacun des constituants envisagés seuls. Avant de rechercher cette action sur le staphylocoque d'Oxford, nous avons injecté à quatre chiens 300 000  $\mu\text{g}$  de dihydrostreptomycine par voie intramusculaire, pour connaître les taux de strep-

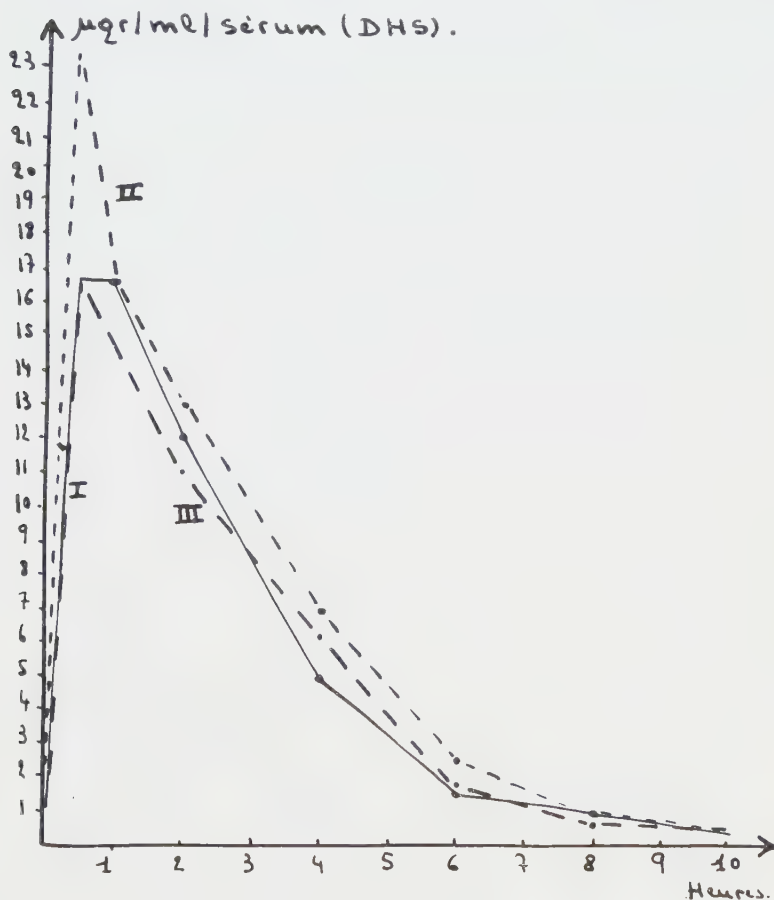


FIG. 2.

tomycinémies associés à ceux de phényracilline dans la recherche du type de synergie.

Le tableau II résume les taux de streptomycinémies observés au cours du temps.

Reproduisons les résultats obtenus sur trois chiens sur un graphique (fig. 2).

Connaissant les taux moyens de phényracilline et de dihydrostreptomycine, nous avons étudié l'action conjuguée de ces deux antibiotiques pendant les dix premières heures, par rapport à celle de chacun d'entre eux, en recherchant le nombre des staphylocoques survivants. Nous avons recueilli du sang à plusieurs reprises, après injection d'une ou des deux substances à plusieurs chiens, et recherché l'action de ces antibiotiques seuls ou associés, soit en sérum pur, soit dans le mélange à parties égales de sérum et de bouillon à pH 7,2-7,3, après ensemencement aussi homogène que possible et après des durées de contact variées.

Voici quelques résultats obtenus dans une première expérience, destinée à rechercher l'action bactéricide des sérums prélevés chez un chien ayant reçu 300 000 U. O. de phényracilline, comparativement à celle des sérums d'un chien recevant 300 000 U. O. de phényracilline et 300 000 U. ( $\mu$ g) de DHS. Après des durées de contact plus ou moins prolongées nous avons prélevé des quantités identiques (0,2 ml) de chaque tube et effectué les numérations des germes survivants sur plaques de gélose nutritive. Les lectures ont été faites après quarante-huit heures (tableau III).

TABLEAU III. — Nombre de germes ml.

			HEURES DE PRELEVEMENTS DES SÉRUMS APRÈS L'INJECTION D'ANTIBIOTIQUE						
	DURÉE DE CONTACT	T	1	2	3	6	8	10	
Sérum  phenyrcilline	14 H	12 800	360	460	900	970	1040	1400	
	36 H	$10^5 \pm 10^6$	0		20	40	50	100	
	60 H.		0	0	0	0	20	40	
Sérum phenyrcilline (1partie) + Bouillon (1partie)	14 H	$> 10^6$	1200	1000	2500	2300	6630	44800	
	36 H	$> 10^6$	10	70	50	220	46000	761280	
	60 H.	$> 10^6$	0	20	0	20	$10^5 \pm 10^6$	$> 10^6$	
Sérum phenyrcilline et D. H. S.	14 H.		10	0	0	140	100	750	
	36 H		0	0	10	0	0	0	
	60 H.	$> 10^6$	0	0	0	0	0	0	
Sérum phenyrcilline + D. H. S. (1partie) + Bouillon (1partie)	14 H		10	0	30	320	3300	4000	
	36 H		0	0	0	20	280	330	
	60 H	$> 10^6$	0	0	0	20	160	1760	

Ce tableau met bien en évidence :

a) Une nette supériorité de l'association sur la phényracilline seule, qui se manifeste sous la forme d'une forte synergie entre



la phényracilline et la streptomycine au cours des dix premières heures après l'injection ;

b) L'action conjuguée du sérum et des antibiotiques dans les conditions de notre expérience.

Dans une deuxième expérience nous avons étudié l'action bactéricide de sérums, contenant, d'une part, de la DHS seule et, d'autre part, de la DHS et de la phényracilline. Dans cette expérience nous avonsensemencé dans une première série de tubes : 148 012 900 germes/ml, et dans la deuxième série dix fois moins : 14 801 290 germes/ml.

TABLEAU IV. — Nombre de germes/ml. Temps de prélèvement des sérums.

	DURÉE DE CONTACT en Heures	T	1H.	2H.	3H.	6H.	8H.	10H.
Sérum - D.H.S.	14	$>10^6$	0	0	70	5400	120.000	180.000
	36	$>10^7$	0	0	0	172.800	$>10^7$	$>10^7$
	60		0	0	0	$>10^6$	$>10^7$	$>10^7$
	84		0	0	100	$>10^6$	$>10^7$	$>10^7$
	108	$>10^7$	0	0	0	$>10^6$	$>10^7$	$>10^7$
Sérum - D.H.S. (1partie) + Bouillon (1partie)	14	$>10^7$	0	0	$10^5-10^6$	$10^5-10^6$	$>10^6$	$>10^6$
	36		0	0	$>10^6$	$10^6-10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	60		0	0	$>10^6$	$10^6-10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	84		0	0	$>10^6$	$>10^7$	$>10^7$	$>10^7$
	108	$>10^7$	0	0	$>10^7$	$>10^7$	$>10^7$	$>10^7$
Sérum (D.H.S.+Phényracilline)	14	$>10^6$	0	0	0	300	2.130	80.000
	36		0	0	0	0	20	8.400
	60		0	0	0	0	0	220
	84		0	0	0	0	0	0
	108	$>10^7$	0	0	0	0	0	0
Sérum (D.H.S.+Phényracilline) (1partie) + Bouillon (1partie)	14	$>10^7$	0	0	0	1.050	$10^5-10^6$	$10^5-10^6$
	36		0	0	0	0	8.700	45.400
	60		0	0	0	10	1.540	2.550
	84		0	0	0	0	520	760
	108	$>10^7$	0	0	0	0	30	320

Les tableaux IV et V résument nos résultats :

A. Ensemencement  $> 10^8$  germes/ml (tableau IV).

B. Ensemencement  $10^7$  à  $2 \times 10^7$  germes/ml (tableau V).

TABLEAU V.

	DURÉE DE CONTACT en Heures	T	1 H.	2 H.	3 H.	6 H.	8 H.	10 H.
Sérum-D.H.S.	14	$> 10^6$	0	0	100	12.800	22.400	$10^5 - (2 \times 10^5)$
	36	$> 10^7$	0	0	10	50	$10^6 - 10^7$	$> 10^7$
	60		0	0	0	0	$> 10^6$	$> 10^7$
	84		0	0	0	0	$> 10^6$	$> 10^7$
	108	$> 10^7$	0	0	0	0	$> 10^7$	$> 10^7$
Sérum-D.H.S. (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$> 10^7$	0	470	11.080	38.000	$10^5 - (2 \times 10^5)$	$> 10^7$
	36		0	0	13.000	$10^6 - 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
	60		0	0	28.160	$10^6 - 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
	84		0	0	25.600	$> 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
	108	$> 10^7$	0	0	34.560	$> 10^7$	$> 10^7$	$> 10^7$
Sérum (D.H.S. + Phényracilline)	14	$> 10^6$	0	0	40	1.050	$10^5 - (2 \times 10^5)$	$10^5 - (2 \times 10^5)$
	36		0	0	0	10	10	3 700
	60		0	0	0	0	0	90
	84		0	0	0	0	0	10
	108	$> 10^7$	0	0	10	0	0	70
Sérum (D.H.S. + Phényracilline) (1 partie) + Bouillon (1 partie)	14	$> 10^7$	0	0	0	7.700	10.000	$> 10^6$
	36		0	0	0	30	1.600	25400
	60		0	0	0	0	110	1160
	84		0	0	0	0	40	80
	108	$> 10^7$	0	0	0	0	10	10

Ces tableaux montrent que :

a) Il y a une synergie entre la dihydrostreptomycine et la phényracilline ; cette synergie se manifeste sous forme d'une véritable potentialisation durant tout le temps de l'expérience.

b) Cette synergie est de plus en plus manifeste au fur et à mesure que la durée de contact augmente.

#### CONCLUSION.

Ce travail met en évidence les faits suivants :

a) La phényracilline, très bien tolérée par le chien, se présente comme une pénicilline-retard, qui assure pendant les vingt-quatre premières heures des concentrations sanguines très supérieures à celles du sel de la N N'-dibenzyléthylènediamine avec la pénicilline (benzathine pénicilline) ;

b) Injectée à doses égales (300 000 unités) avec la dihydrostreptomycine elle agit avec cet antibiotique en synergie avec potentialisation des effets pendant les dix heures qui suivent l'injection et dans les conditions de notre expérience.

## SUMMARY

### EXPERIMENTAL DATA ON PHENYRACILLIN AND ITS ASSOCIATION WITH DIHYDROSTREPTOMYCIN.

The following facts have been demonstrated :

a) Phenyracillin is quite well tolerated by dogs. It behaves like a penicillin endowed with protracted activity, inducing during the first 24 hours much higher blood concentrations than those obtained with benzathine-penicillin.

b) When associated with the same doses of dihydrostreptomycin (300 000 U.), it exercises a synergic effect and enhances the action of dihydrostreptomycin during the 10 hours following injection.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] NOMINÉ (G.), MATHIEU (J.), JEQUIER (R.) et BELLET (P.). *Ann. Pharm. franç.*, 1958 (*sous presse*).
  - [2] PENAU (H.), VELU (H.), DESTOUCHES (P.) et KARATCENTZEFF (N.). *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 301.
  - [3] PRATT (R.) et DUFRENOY (J.). *Stain Technology*, 1946, **23**, 187.
  - [4] SUREAU (B.) et CHABBERT (Y.). *Biol. méd.*, 1948, **37**, 1.
  - [5] CSERMELY (E.). *Minerva Medica*, 1957, **48**, 4107.
  - [6] MARSON (P.) et AZERAD (E.). *Gaz. méd. France*, 1958, **65**, 1091.
  - [7] BEERENS (H.) et MACQUET (V.). *Presse méd.*, 1958, **66**, 1418.
-

# **SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE DE CERTAINES SOUCHES DE VIBRIONS HABITUELLEMENT CONSIDÉRÉS COMME SAPROPHYTES**

par H. JACOTOT, J. LEVADITI et A. VALLÉE (\*)  
(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale  
et Service d'Anatomie Pathologique*)

Plusieurs fois, au cours des dernières années, nous avons isolé, en partant d'avortons de vaches, des vibrions aptes à se multiplier abondamment sur les milieux aérobies usuels, comme des vibrions saprophytes, mais possédant un pouvoir pathogène très prononcé pour la femelle gestante de cobaye. Nous rapporterons ici les résultats de l'étude que nous avons faite de trois de ces souches.

## **ORIGINE DES SOUCHES.**

*Souche B2* (Yonne), obtenue du cerveau d'un fœtus de vache expulsé après huit mois et demi de gestation ; dans la même étable, on avait isolé trois semaines avant *V. fœtus* à partir du contenu stomacal d'un fœtus de 7 mois. Le vibrion B2 est associé à *E. coli* ; trois filtrations sur bougie L3 ne permettent pas son isolement. On inocule la culture mixte, vibrion et coli, à quatre femelles gestantes de cobayes, par voie péritonéale ; l'une meurt dans les vingt-quatre heures, les trois autres avortent dans les quinze heures ; le vibrion est extrait, à l'état de pureté, de la lumière utérine de l'une de ces dernières, de la lumière utérine et des fœtus d'une autre.

*Souche B4* (Seine-et-Marne), obtenue du testicule d'un fœtus de vache expulsé après sept mois de gestation ; dans la même étable, on avait isolé sept semaines avant *V. fœtus* à partir du cordon ombilical d'un fœtus de 6 mois. La première culture du vibrion B4 est polluée ; un passage sur bougie L3 permet d'obtenir le microbe à l'état de pureté.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

*Souche R* (Haute-Saône), obtenue de tous les viscères d'un fœtus de vache expulsé après huit mois de gestation ; la première culture n'est pas pure ; on la passe sur bougie L3 ; le vibrion franchit à l'état de pureté une bougie qui a été maintenue dans le bouillon de culture, pendant quinze heures.

#### CARACTÈRES CULTURAUX ET MORPHOLOGIQUES.

Les souches B2 et R ont été bien étudiées. Elles se développent d'emblée en bouillon et sur gélose ordinaires. En bouillon on

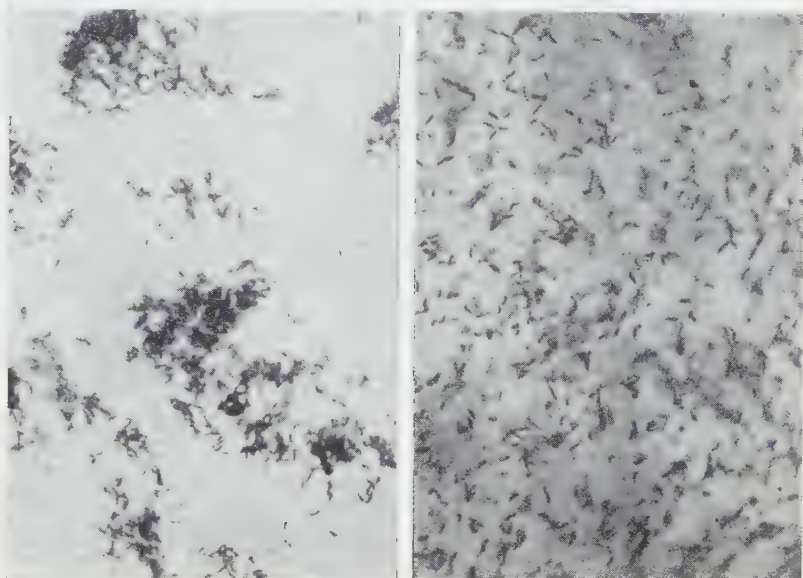


FIG. 1. — Vibrion B4. Étalements de culture en bouillon. Coloration de Gram. A gauche var. non irisée, à droite var. irisée. Oc.  $\times 6$  phot., Ob.  $\times 50$  imm., Gr.  $\times 610$ .

observe après vingt-quatre heures des éléments très mobiles, en bâtonnets dont certains présentent un espace clair après coloration, ou en virgules, en S ouverts, ou encore en spirilles. Sur gélose ordinaire une dissociation se produit, qui donne des colonies irisées à reflets vert pâle et des colonies non irisées. Après étalement et coloration les microbes constituant les colonies irisées diffèrent quelque peu de ceux des colonies non irisées ; ils sont formés pour une part plus importante d'éléments courts, incurvés ou en S et pour une part moins importante d'éléments spiril-



laires fins et longs. Dans l'eau de condensation on observe des éléments semi-lunaires dont la partie centrale se colore mal et qui présentent à chacune de leurs extrémités une granulation se colorant fortement. Les repiquages en bouillon gélosé à 2 p. 1000 des variétés irisées et non irisées conduisent à des constatations analogues (fig. 1).

#### CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

Ces microbes possèdent en commun avec *V. fœtus* plusieurs caractères fondamentaux : ils ne forment pas d'indole, ne dégagent qu'inconstamment de l' $\text{SH}_2$  et ne liquéfient pas la gélatine ; mais, contrairement à *V. fœtus*, ils poussent après ensemencement par piqûre en gélose profonde et se multiplient en milieu hyper-tonique (1).

#### PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES.

Des lapins ont été préparés par des inoculations intraveineuses en série de suspensions de chacune de ces souches ; leurs sérums se sont montrés agglutinants vis-à-vis de l'antigène correspondant à des taux voisins du 1/15 000 ; 6 sur 8 étaient totalement dépourvus d'agglutinines vis-à-vis des antigènes préparés avec *V. fœtus*, et notamment avec la souche 483 de Florent ; mais 2 (B2 irisée et B2 non irisée) agglutinaient cet antigène à la dilution de 1/120. Ce titre n'a pas de signification en matière de vibriose, mais si faible qu'il soit, il ne laisse pas de surprendre chez le lapin dont le sérum est toujours totalement inactif au départ.

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE COBAYE.

Il est parfaitement caractérisé et s'exerce à l'égard des femelles vides aussi bien que des femelles gestantes.

La *variété non irisée* de la souche B2 a été inoculée par voie péritonéale à 8 femelles gestantes ; elle a déterminé l'avortement dans les vingt-quatre heures chez 6 d'entre elles et dans les quarante-huit heures chez une autre ; le vibriion été retrouvé dans la lumière de l'utérus chez 6 de ces femelles. Enfin, une femelle non gestante qui avait été inoculée dans les mêmes conditions est morte dans les quarante huit heures ; le vibriion a été retrouvé dans tous les viscères et dans la lumière des deux cornes utérines.

La *variété irisée* de la même souche a été inoculée à 12 cobayes gestantes ; 8 sont mortes dans des délais très courts, inférieurs à un jour, avant même que l'expulsion des fœtus ait pu s'effec-

(1) Nos constatations concordent avec celles du Dr A. Florent, de Uccle - Brucelles, que nous remercions d'avoir bien voulu examiner les souches B2 et B4.

tuer ; le vibron a été retrouvé régulièrement dans le foie et dans le sang du cœur, et chez plusieurs animaux dans le cerveau, la lumière des cornes utérines ou les fœtus. En outre, 4 femelles ont avorté dans les vingt-quatre heures et, après sacrifice, le vibron a été retrouvé dans leurs viscères ainsi que dans la lumière utérine ou les fœtus. Enfin, 2 femelles qui n'étaient pas en gestation sont mortes dans les vingt-quatre heures ; le vibron a été retrouvé dans les viscères et dans la lumière des cornes utérines.

Dans toutes les expériences rapportées ici on a inoculé 1 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon gélosé, avec addition de mucine, selon le protocole que nous avons fait connaître antérieurement, ou sans mucine [4].

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE LAPIN.

Nous n'en avons pas fait l'étude méthodique, mais, au cours de la préparation des sérums agglutinants, plusieurs des lapins qui recevaient les suspensions de ces vibrions sont morts rapidement avec une vive congestion des viscères.

#### POUVOIR PATHOGÈNE POUR LES PETITS RUMINANTS.

Nous nous sommes adressés à des animaux de ce groupe parce que nous disposons de brebis et béliers, chèvres et boucs, animaux qui, dans les conditions naturelles, sont sensibles à la vibriose, les premiers surtout.

La suspension normale de culture sur gélose ordinaire de vingt-quatre heures inoculée dans la veine jugulaire aux doses de 10 cm<sup>3</sup> ou de 5 cm<sup>3</sup> a entraîné la mort dans 7 cas sur 12 chez les brebis et béliers, 2 cas sur 3 chez les chèvres et boucs ; il s'agissait alors de toxi-infections aiguës rapidement mortelles, le plus souvent en moins de douze heures. Dans les heures suivant l'inoculation, on a noté une forte dyspnée et des émissions sanguantes à l'anus et à la vulve. Les ensemencements effectués à partir des prélèvements usuels sur les cadavres sont toujours restés négatifs.

Le filtrat sur bougie L3 de culture en bouillon ordinaire de quatre jours, injecté dans la veine, à la dose de 25 cm<sup>3</sup>, a tué dans les mêmes délais un bélier sur deux ; un autre bélier est mort dans les mêmes conditions, après injection de corps microbiens obtenus sur gélose, tués par action du merthiolate, puis lavés trois fois dans l'eau physiologique.

Il paraît hors de doute que les vibrions en question sécrètent une exotoxine et il est vraisemblable qu'ils élaborent aussi une endotoxine, car il est peu probable que les accidents déterminés

par les microbes tués et lavés soient dus à une exotoxine non libérée.

Il semblerait, le nombre d'animaux inoculés n'autorisant pas une appréciation plus formelle, que la souche B2, plus pathogène, soit douée d'un pouvoir toxique plus élevé que la souche B4 et

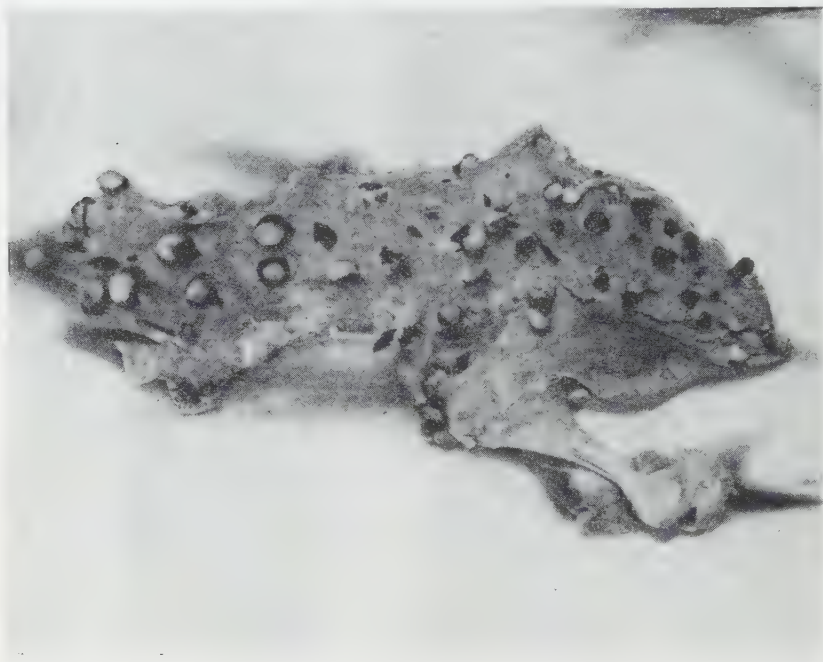


FIG. 2. — Brebis 343 inoculée avec une culture sur gélose et morte en douze heures : lésions hémorragiques de l'utérus intéressant notamment les cotylédons.

que, de cette souche B2, les éléments formant des colonies non irisées soient plus toxiques que les autres.

Les lésions macroscopiques se présentent avec une constance remarquable, mais offrent des degrés variables avec l'intensité des troubles et la durée de leur évolution. A l'autopsie des animaux morts dans de courts délais (dix à quinze heures) on note les altérations suivantes : épanchement pleural rose plus ou moins abondant, parfois coagulé ; congestion pulmonaire avec îlots de pneumonie et petites hémorragies dans le parenchyme ; suffusions sous la plèvre pariétale ; myocarde décoloré, suffusions sous le péricarde et sous l'endocarde le long des piliers ventriculaires et à la surface des valvules et des oreillettes, sur-

tout dans le cœur gauche ; foie dégénéré et vésicule distendue ; splénomégalie avec ramollissement de la pulpe ; reins congestionnés ; muqueuse vésicale enflammée, piquetée d'hémorragies ; congestion intestinale violente avec pétéchies, dans certaines parties du grêle surtout. Il faut signaler enfin des altérations utérines parfois intenses ; chez une brebis (n° 343), nous avons observé des hémorragies sous-muqueuses multiples coiffant les cotylédons dans la partie profonde des cornes, ou formant à leurs

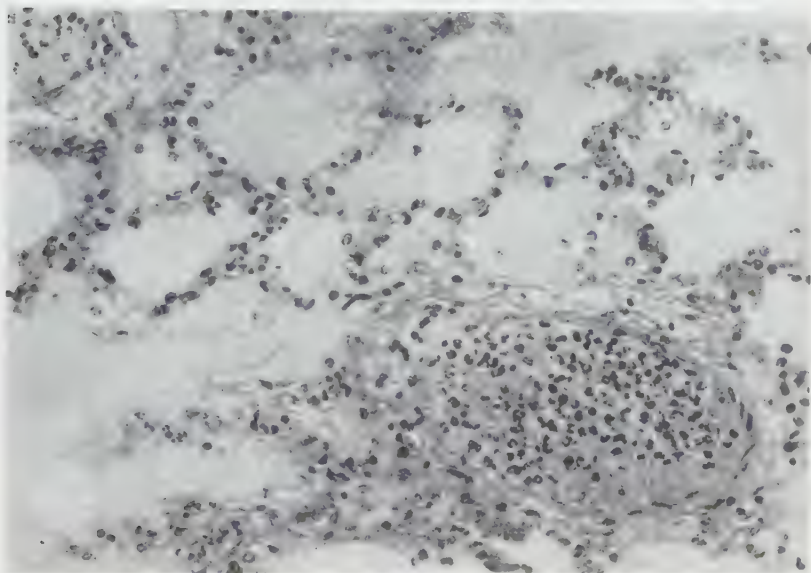


FIG. 3. — Bouc 353 inoculé avec une culture en bouillon de *V. fetus* et mort en quelques heures. Broncho-pneumonie suraiguë oedémateuse et nécrosante avec importante polynucléose dans un rameau d'une des veines pulmonaires. Ex. Y. 256. Hémalun-éosine-safran. Oc.  $\times 6$ , Ob.  $\times 23$ , Gr.  $\times 260$ . Ecran Wratten 15 (M<sup>me</sup> O. Nazimoff et J. Grzelak).

bases des anneaux ou des croissants, dans le voisinage du col (fig. 2).

Les examens histo-pathologiques ont permis des constatations supplémentaires dont nous donnons ici un exposé global :

*Bélier 346* mort douze heures après l'inoculation intraveineuse de 5 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon de 24 heures de la souche B2.

*Examen X 2.273.* — Poumon : broncho-pneumonie suraiguë hémorragique et suppurée avec exsudat fibrineux bronchique et alvéolaire.

Foie : cellules hépatiques granuleuses ; hémolyse portale avec mono-

cytes et cellules endothéliales desquamées en placards dans la lumière des branches de la veine porte.

Rein : destruction massive aiguë du parenchyme rénal avec hyperémie hémorragique interstitielle. Vacuolisation des tubes et nécrose des glomérules sont les signes d'une néphrite toxique aiguë.

Bélier 347 mort dix-huit heures après l'inoculation intraveineuse de 25 cm<sup>3</sup> de filtrat sur bougie L3 de la même culture.

*Examen X 2.274.* — Poumon : petits foyers d'hyperémie hémorragique avec alvéolite œdémateuse ; les cellules rétractées à noyaux pyknotiques témoignent d'une action cytotoxique directe.

Foie : dégénérescence granuleuse des cellules hépatiques avec nécrose des cellules de Küpffer et décollement des endothéliums des capillaires sinusoides.

Rein : extrêmement hémorragique avec lésions épithéliales des tubes identiques à celles relevées chez le bélier 346. Néphrite aiguë glomérulo-épithéliale de cause toxique évidente.

La figure 3 montre les lésions pulmonaires d'un bouc (n° 353) mort de broncho-pneumonie suraiguë, œdémateuse, dix heures après l'inoculation intraveineuse de 5 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon de la même souche B2 (*Examen Y 256*).

Pour terminer cet exposé sommaire d'histo-pathologie, nous signalerons deux particularités. La rapidité de l'évolution et la gravité des lésions œdémateuses et hémorragiques sont parfois telles qu'elles font penser à un phénomène de Reilly (chèvre 337). D'autre part, chez les sujets qui survivent, la régression des accidents pulmonaires peut être assez lente pour que, macroscopiquement et microscopiquement, les lésions gardent le caractère infectieux aigu pendant plusieurs semaines (brebis 333).

#### CONCLUSIONS.

Certaines souches de vibrions qui possèdent les principaux caractères biochimiques de *V. fetus*, mais qui s'en différencient sérologiquement et se développent abondamment en aérobiose dans les milieux de culture ordinaires, possèdent vis-à-vis du cobaye et en particulier de la femelle gestante de cobaye un pouvoir pathogène comparable à celui des souches les plus virulentes de *V. fetus*. Cultivées dans les milieux usuels, elles élaborent des substances toxiques capables de tuer en moins de douze heures les ovins et les caprins. Après inoculation intraveineuse de quelques centimètres cubes, de tels animaux présentent presque toujours des lésions intenses de broncho-pneumonie œdémateuse et nécrosante et souvent des altérations hémorragiques et dégénératives du rein. Les lésions sont pratiquement identiques chez les animaux n'ayant reçu que le filtrat de culture.



Trois notions nous paraissent découler de ces constatations :

1° L'action pathogène sur le cobaye ne saurait différencier sûrement de *V. fœtus* certains vibrions considérés habituellement comme des microbes saprophytes.

2° De tels vibrions isolés à plusieurs reprises se révèlent d'un pouvoir toxigène puissant.

3° On est, pour le moins, en droit de se demander si, dans les conditions naturelles, ces microbes sont réellement inaptes à déterminer des troubles dans les espèces domestiques.

### SUMMARY

#### PATHOGENICITY OF CERTAIN *VIBRIO* STRAINS. USUALLY CONSIDERED AS SAPROPHYTIC.

Certain *Vibrio* strains possess the main biochemical properties of *Vibrio fœtus*, but are serologically different from it, and grow abundantly in usual culture media in aerobic conditions. These strains possess for guinea pigs, and particularly pregnant females, a pathogenicity as high as that of the most virulent strains of *Vibrio fœtus*. In usual media, they excrete toxic substances, which kill sheep and goats in less than twelve hours. After intravenous inoculation of a few cubic centimeters, these animals almost always show severe lesions of acute broncho-pneumonia, and often hemorrhagic and necrotic kidney and liver alterations. The lesions are practically identical in animals only receiving culture filtrates.

Three conclusions can be drawn from these findings :

1. The pathogenicity for guinea pigs is not sufficient to constitute a differential character between *Vibrio fœtus* and certain *Vibrios* usually considered as saprophytic.

2. Such non unfrequently isolated *Vibrios* are highly toxogenic.

3. The incapacity of these germs to induce diseases in domestic animals is questionable.

### BIBLIOGRAPHIE

[1] JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 591.

---

## **CROISSANCE ET TOXINOGENÈSE DIPHTÉRIQUES EN CULTURE AGITÉE, SUR MILIEU SYNTHÉTIQUE**

par M. RAYNAUD, J. ALOUF et R. MANGALO (\*).

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches)*

Divers auteurs ont obtenu des taux élevés de toxine diphtérique en culture agitée [1, 5]. Nous avons, il y a quelques années [6], étudié les rapports entre la croissance et la toxinogénèse du bacille diphtérique et montré que, contrairement à ce que l'on observe avec d'autres toxines, la concentration endocellulaire de toxine diphtérique reste toujours très faible, pratiquement négligeable. La toxine est excrétée pendant la phase exponentielle de croissance. Nous avons utilisé pour ces expériences des milieux complexes [7, 8] ou semi-synthétiques [9, 10], avec des résultats qualitativement semblables. La toxine apparaissait très précocement dans le milieu de culture. En 1957, Yoneda et Pappenheimer [11] ont effectué une étude analogue sur milieu synthétique et sont arrivés à des conclusions très différentes des nôtres. Ils considèrent que le bacille diphtérique ne libère que des traces de protéine extracellulaire et de toxine pendant la phase exponentielle de croissance. Ces auteurs ayant utilisé une souche particulière (souche Yoneda) [11 bis] capable de pousser sur un milieu synthétique très simple, on pouvait se demander si la divergence entre leurs résultats et les nôtres résultait de ces conditions particulières.

Nous avons donc repris l'étude de ce problème avec la souche Yoneda et un milieu synthétique simple analogue à celui de cet auteur [11, 12].

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES.**

La souche utilisée a été obtenue à partir d'une souche que nous avait adressée le Dr Yoneda, que nous sommes heureux de remercier ici. Cette souche, qui pousse bien sur le milieu de cet auteur, poussait mal et irrégulièrement sur notre milieu où l'acide glutamique est utilisé comme source principale d'azote, au lieu de l'asparagine. La pousse était surtout médiocre en culture agitée.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

Sur le même milieu en tube droit non agité, il se formait des voiles minces. En effectuant des passages alternés d'un voile âgé de 6 à 8 jours sur tube agité, d'un tube agité à une culture non agitée, etc., nous avons obtenu finalement une variante qui donnait une culture abondante en milieu agité; mais le taux de toxine restait faible, 10 Lf/ml au maximum.

Le faible taux de toxine nous a paru provenir de l'hétérogénéité de la souche. Nous avons supposé que le pourcentage de germes toxinogènes dans le clone considéré était relativement faible.

Nous avons alors étalé une série de suspensions obtenues par dilution d'une culture en phase exponentielle (culture agitée), dilutions telles que 0,5 ml étalé sur une boîte de Petri de 11 cm de diamètre, donnait naissance à 50-100 colonies. Le milieu employé était le milieu synthétique décrit, gélosé et additionné de sérum antidiphtérique, de façon à réaliser une concentration finale de 10 Lf (d'antitoxine) par millilitre. Les colonies toxigènes s'entourent d'une zone de précipitation, comme l'avait montré Ouchterlony dans ses premières expériences [13, 14].

Nous avons observé que toutes les colonies n'étaient pas toxigènes dans les conditions indiquées (concentration en antitoxine : 10 Lf/ml). Voici le résultat de quelques expériences :

Boîte	NOMBRE DE COLONIES ISOLÉES	POURCENTAGE DE COLONIES TOXIGÈNES
N° 1 .....	105	27 %
N° 2 .....	86	55 %
N° 3 .....	69	17 %
N° 4 .....	77	32 %
N° 5 .....	58	20 %

Nous avons alors repiqué systématiquement les colonies les plus toxigènes (c'est-à-dire celles qui donnaient l'anneau de précipitation de plus grand diamètre). A partir d'un des clones ainsi isolés, nous avons obtenu une souche qui paraît relativement stable et donne en culture non agitée 50-60 Lf/ml, en culture agitée 30 à 50 Lf/ml, dans les conditions optima. Cette souche est dénommée souche « Garches ». Elle est conservée sous forme d'une suspension dense en lait stérile, à l'état congelé (— 15°).

La semence est préparée à partir d'une culture-stock ainsi conservée. Le contenu d'un tube, après décongélation, est inoculé à raison de 1 ml dans un tube contenant 5 ml de milieu synthétique (tube en T). Les tubes sont placés dans un agitateur basculant placé dans un bain-marie à 34° et agités pendant trois jours. On enseme une série de tubes en T (5 ml de milieu), chacun avec 0,1 ml de la culture précédente. Le milieu contient 150 µg de fer ajoutés par litre. On place au bain-marie à 34° avec

agitation pendant vingt-quatre heures. La culture est alors en pleine phase exponentielle. On peut aussi utiliser de gros tubes en T de 500 ml de capacité, contenant 50 ml de milieu.

Les germes sont recueillis stérilement par centrifugation (4 000 tours/minute) et remis en suspension dans un volume approprié de milieu synthétique stérile (sans fer ajouté).

### MILIEU DE CULTURE.

Le milieu utilisé est voisin de celui décrit par Yoneda [14, 12] et a été mis au point par l'un d'entre nous [15]. Sa composition finale par litre est reproduite ci-dessous :

Maltose .....	18,800 g
Acide L(+) glutamique .....	8,010 g
DL-méthionine .....	0,400 g
L-cystine .....	0,400 g
Acide succinique .....	1,800 g
Acide lactique .....	1,809 g
Cl— .....	3,060 g
P .....	1,140 g
NH <sub>4</sub> + .....	0,157 g
(N total : 1,020)	
Mg++ .....	45,000 mg
Acide nicotinique .....	2,300 mg
β-alanine .....	2,300 mg
Acide pimélique .....	0,150 mg
Thiamine .....	0,250 mg
Cu++ .....	2,52 μg
Zn++ .....	1,80 μg
Mn++ .....	0,82 μg

On le prépare de la façon suivante (inspirée de la technique de Mueller et Miller [16]) :

#### *Solution 1 :*

Acide L(+) glutamique (chlorhydrate recristallisé) .....	10 g
DL-méthionine .....	0,4 g
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> (R. P.) .....	5,0 g
Succinate de sodium, 6 H <sub>2</sub> O (Merck) .....	3,0 g
SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> neutre (R. P.) .....	1,0 g
NaCl (R. P.) .....	1,3 g
Acide lactique pur (d = 1,248) .....	1,45 ml

Dans un Erlenmeyer de 300 ml, contenant 75 ml d'eau bidistillée chaude (60°-70°), on fait dissoudre les uns après les autres les produits ci-dessus. On laisse refroidir. On ajuste le pH à 7,8 par addition de lessive de soude. Le pH final est mesuré à l'électrode de verre (il faut environ 15 à 17 ml de lessive de soude). Compléter à 100 ml.

On élimine le fer par le procédé classique de Mueller. On ajoute pour cela à la solution précédente 1,5 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (R. P.) à 50 p. 100. On chauffe à l'ébullition douce que l'on maintient pendant cinq minutes. On laisse reposer et on filtre sur

un papier filtre, préalablement lavé avec de l'acide chlorhydrique dilué.

On ajoute au filtrat clair 0,5 ml de la même solution de  $\text{CaCl}_2$  et on répète l'opération précédente.

Le fer contenu dans les divers réactifs est ainsi éliminé (95 p. 100 sont éliminés).

La solution 1 est concentrée dix fois. On la dilue dix fois lors de la préparation du milieu définitif.

L'élimination du fer se fait mieux et est plus complète en opérant sur des solutions concentrées.

#### Solution 2 :

$\text{SO}_4\text{Mg}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ .....	22,500	g
Acide nicotinique .....	0,115	g
$\beta$ -alanine .....	0,115	g
Acide pimélique .....	0,0075	g
Thiamine .....	0,0125	g
$\text{SO}_4\text{Cu}$ , 5 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	5	ml
$\text{SO}_4\text{Zn}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	4	ml
$\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ solution à 1 p. 100 .....	1,5	ml
HCl concentré (redistillé) .....	3	ml
$\text{H}_2\text{O}$ bidistillée .....	q. s. p.	100 ml

On dissout tous les constituants dans l'eau, sauf l'acide nicotinique qui est dissous à part dans 1 ml d'HCl concentré et ajouté au reste. La solution se conserve à la glacière pendant très longtemps.

#### Solution 3 :

L(—) cystine recristallisée .....	20	g
HCl concentré redistillé .....	20	ml
$\text{H}_2\text{O}$ bidistillée .....	q. s. p.	100 ml
Conservation à la glacière au moins six mois.		

#### Solution 4 :

$\text{SO}_4\text{Fe}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ .....	0,496	g
HCl N/1 .....	100	ml
$\text{H}_2\text{O}$ .....	q. s. p.	1 000 ml

#### Solution 5 :

Maltose, 1 $\text{H}_2\text{O}$ (Merck) .....	100	g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ , 12 $\text{H}_2\text{O}$ .....	6,5	g
$\text{H}_2\text{O}$ .....	q. s. p.	100 ml

Dissoudre le phosphate à chaud dans 130 ml d'eau. Ajouter le maltose par petites fractions jusqu'à dissolution totale. Compléter le volume à 200 ml.

Éliminer le fer : ajouter pour cela 4 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$  à 50 p. 100. Placer l'Erlenmeyer dans un appareil agitateur-vibreux (appareil Jouan). Laisser agiter pendant dix minutes. On évite ainsi le chauffage du maltose. Filtrer. Ajuster le pH à 5,0 avec de l'acide chlorhydrique sans fer. Répartir en flacons. Stériliser à 105° pendant quinze minutes. On n'observe aucun brunissement lors de cette stérilisation. La solution reste à peine colorée. L'hydrolyse du maltose est négligeable.



Le milieu définitif est préparé en mélangeant les diverses solutions dans les proportions suivantes :

Solution 1 .....	100 ml
H <sub>2</sub> O .....	895 ml
Solution 2 .....	2 ml
Solution 3 .....	2 ml
Solution 4 fer q. s. p. taux de fer optimum, ici .....	150 µg fer/l

Le pH est voisin de 7,0-7,2. Répartir, Stériliser à 115° pendant vingt minutes. Ajouter stérilement au milieu la solution 5 stérile (maltose) : 4 ml pour 100 ml de milieu.

Le phosphate résiduel, après élimination des divers précipités, est

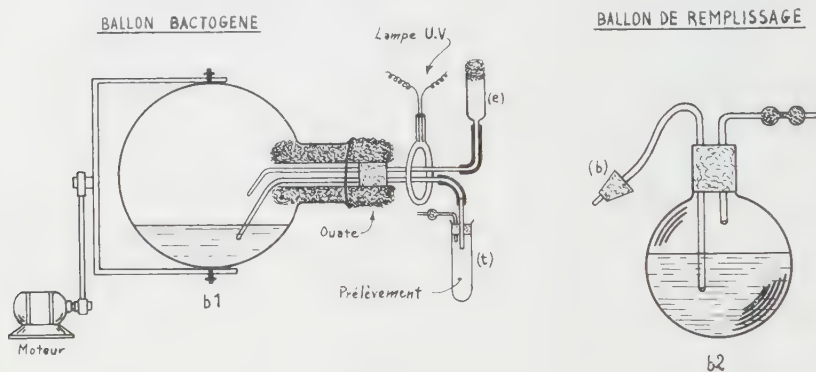


FIG. 1.

titré par la méthode de Fiske et Subbarow [17]. Exprimé en P, son taux est voisin de 1,12 g par litre.

Le milieu final, avant addition de fer, contient moins de 25 µg de fer par litre.

Le fer est dosé par la méthode de Jackson [18] modifiée par Woiwood [19], en utilisant comme complexant l'orthophénanthroline.

Le taux de Cl<sup>-</sup>, déterminé par la méthode de Charpentier-Volhard, est de 3,0 g par litre.

Pour suivre commodément les rapports entre la croissance et la toxinogénèse, il faut que la croissance ait lieu dans un récipient assez vaste, permettant de faire des prélèvements fréquents sans risque de contamination et sans que le volume total des prélèvements entraîne de modifications importantes du rapport entre la surface et le volume de la culture (ce rapport conditionne en effet la vitesse des échanges gazeux). Nous avons utilisé le dispositif du ballon tournant dérivé du ballon bactogène de Monod [20], et que nous avons décrit dans un travail antérieur [6]. Le ballon en pyrex a une capacité de 5 l et contient 1 l de milieu. La vitesse de rotation est de 60 tours/minute. L'agitation est très vive, mais le liquide ne mousse pas (fig. 1).

Le ballon et l'ensemble de l'appareil sont placés à la chambre-étuve, à 34° ± 0,5°.

La croissance a été suivie par détermination de la densité optique des suspensions microbiennes au photomètre Klett-Summerson, avec l'écran 54. Pour les suspensions denses, dépassant 200 unités Klett, il faut diluer les suspensions, la relation de proportionnalité entre l'N total bactérien et la densité optique n'étant valable qu'entre 0 et 200 unités Klett dans le cas du bacille diphtérique. Rappelons que 100 unités Klett correspondent à une densité optique de 0,200.

La correspondance entre le taux d'azote bactérien et la mesure de densité optique à l'appareil de Klett a été établie sur des suspensions obtenues par culture (sur le même milieu) de la souche Yoneda. Les germes ont été prélevés à divers moments au cours de la phase exponentielle. Le culot bactérien a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique par centrifugation. L'azote total a été titré par la méthode de Kjeldahl. 100 unités Klett correspondent à 28  $\mu\text{g}$  N bactérien par millilitre.

La semence est prélevée comme il a été indiqué (après vingt-quatre heures de culture agitée sur le même milieu). La quantité de germes employée était telle qu'après homogénéisation au temps zéro dans le ballon tournant, la densité optique initiale (80) était comprise entre 40 et 60 unités Klett (moyenne, 14  $\mu\text{g}$  d'N bactérien par millilitre).

Le taux de fer ajouté était de 150  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Ce taux est le taux optimum, dans les conditions indiquées, pour la toxinogénèse. Il a été déterminé après une série d'expériences portant sur des cultures agitées effectuées avec des taux variables de fer ajouté (de 0 à 4 000  $\mu\text{g}$  de fer).

La toxine a été titrée par floculation, selon la technique classique de Ramon [21]. On ne peut déceler ainsi qu'une concentration relativement élevée de toxine (environ 10 Lf/ml), si bien que la floculation ne permet pas de suivre les premiers stades d'apparition de la toxine.

C'est pourquoi nous avons aussi, dans tous les cas, effectué le titrage biologique de cette dernière.

Nous avons déterminé le nombre de DMR/ml. La DMR est définie selon Jensen [22] comme la plus faible dose de toxine qui, injectée par voie intradermique au lapin blanc sous le volume de 0,1 ml, provoque l'apparition d'une zone érythémateuse de 8 mm, la lecture étant faite au bout de quarante-quatre heures. La détermination exacte est facilitée par l'injection d'une série de dilutions sous la peau du lapin dans la région dorsale, selon la méthode de Jerne [23]. Pour chaque détermination, on utilise 10 dilutions environ et on emploie 2 à 4 lapins. Le chiffre donné correspond à la moyenne de ces déterminations.

La correspondance entre les unités de floculation et le nombre de DMR/ml n'est pas fixe.

Pour une toxine purifiée, apparemment dépourvue de toxoïde, nous avons retrouvé la valeur donnée par Jerne : 1 Lf/ml = 200 000 DMR/ml.

Lorsqu'on examine les toxines prélevées à divers stades de la croissance, on observe des variations dans la correspondance entre le pouvoir floculant et le pouvoir toxique. C'est pourquoi

nous n'établirons pas de conversion entre ces deux types d'unités, et donnerons les concentrations déterminées expérimentalement en Lf/ml et en DMR/ml.

La floculation a été faite dans tous les cas :

1° Avec un sérum étalon local (sérum ER) qui a été soigneusement standardisé vis-à-vis du sérum étalon international de floculation.

Ce sérum, comme tous les sérums commerciaux, est un sérum complexe [24, 25].

2° Avec un sérum à une zone [24, 25] (sérum 1451 bis) qui ne donne de réaction qu'avec la toxine diphtérique purifiée, sans présenter de réaction avec les antigènes accessoires.

Nous n'avons pas trouvé d'écart entre les deux types de détermination. Ceci indique que (dans le cas qui nous intéresse à tout

TABLEAU I.

Temps (heures)	Croissance (unités Klett)	Toxine		N protéique soluble total µgN/ml	N prot./ N bact. x 100
		Lf/ml	DMR/ml		
0	40	Non décelable par floculation	<100		
1	47	id	<100		
2	43	id	100		
3	58	id			
4	74	id	100	1,93	9 %
5	105	id	200		
6	135	id	500		
7	155	id			
8	210	id	500		
9	280	id			
10	340	id		7,15	7 %
11	380	id	3000		
12	570	id	30000		
13	600	id			
14	680	id	240000	24,09	4,5 %
15	750	id			
16	800	7,5	8.10 <sup>6</sup>	33,8	6,2 %
18	965	10			
26	1900	25	10 <sup>7</sup>	55,3	9,8 %
33	2100	40			
48	2100	50	10 <sup>8</sup>		

le moins) la floculation mesure bien la concentration de la toxine et non celle d'antigènes accessoires.

L'examen des filtrats par précipitation spécifique en gel confirme cette interprétation.

L'azote protéique soluble total représente l'ensemble des protéines et des peptides précipitables par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 que les germes ont libérés dans le milieu. Il est déterminé sur le liquide surnageant obtenu après élimination des germes par centrifugation à la centrifugeuse « International » (20 000 tours/minute, quinze

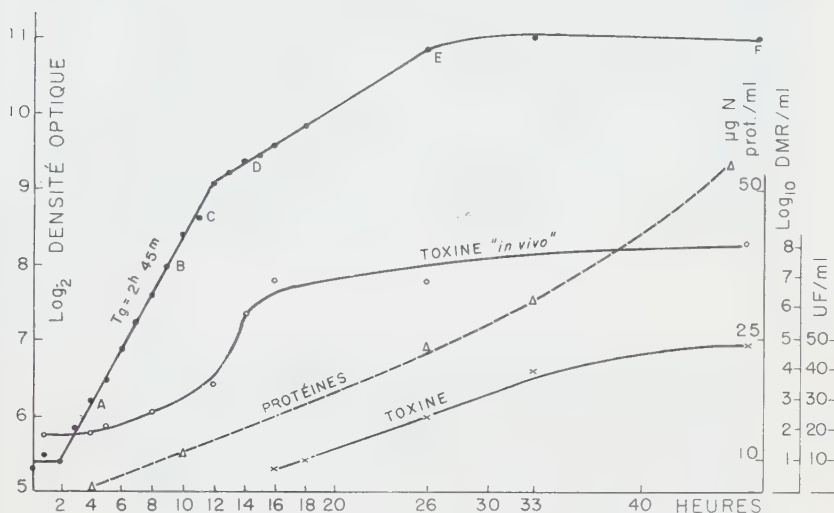


FIG. 2.

minutes). Après addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 10 p. 100, on laisse le précipité se former pendant une heure. On lave deux fois à l'acide trichloracétique à 5 p. 100. On dissout le précipité dans la soude N/1 et on effectue le transfert et le lavage dans les mêmes conditions que pour les précipitations quantitatives. L'azote total est titré après kjeldahlisation. L'ammoniaque est distillé dans un appareil type Markham modifié.

L'analyse immunologique de certains surnageants a été effectuée, après concentration par la méthode de Oudin [26], technique Oakley-Fulthorpe [27] et par celle d'Ouchterlony [28].

La concentration a été réalisée par ultrafiltration selon Quigley [28 bis] et Ramshorst [28 ter]. 1 000 ml de milieu ont été ramenés ainsi à 20 ml. Cette technique évite la dénaturation des constituants protéiques.

Huit expériences identiques ont été effectuées. Nous avons résumé les résultats de l'une d'entre elles dans le tableau I et la figure 2.

## DISCUSSION.

Ces résultats démontrent que, dans les conditions de taux optimum de fer pour la toxinogénèse (ici, 150  $\mu\text{g}$  de fer par litre), la croissance s'effectue selon les lois normales. On observe une phase exponentielle nette, durant, avec le type d'inoculum choisi, douze heures au moins. Le temps de génération pour la souche employée est de deux heures quarante-cinq minutes. Puis une phase de croissance ralentie se manifeste, qui dure douze à seize heures, avant que la croissance ne cesse.

Si on mesure la toxine formée par floculation, on ne trouve de toxine qu'à partir de la seizième heure et la courbe obtenue, extrapolée, ne semble pas passer par l'origine.

Mais si on détermine la toxine par titrage biologique, beaucoup plus sensible, on constate que la toxine est sécrétée dans le milieu dès la deuxième heure de la croissance. La quantité de toxine sécrétée augmente très vite pendant toute la période de croissance exponentielle et continue à augmenter pendant la phase de croissance ralentie.

On remarquera que, grâce à l'emploi d'un inoculum prélevé en phase exponentielle dans un milieu analogue, la période de latence est de très courte durée.

Les expériences de Yoneda et Pappenheimer [41] ont été faites dans des conditions différentes. Elles étaient inspirées par l'hypothèse que la toxine ne se produit que lorsque les bactéries se développent dans un milieu carencé en fer. La croissance a donc été suivie dans un milieu complètement privé de fer, avec un inoculum très important et formé dans un milieu contenant 500  $\mu\text{g}$  de fer par litre.

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — (1) Filtrat de culture de 8 heures concentré cent fois. (2) Filtrat de culture de 10 heures concentré cinquante fois. (3) Filtrat de culture de 18 heures concentré vingt fois. (4) Filtrat de culture de 48 heures en excès de fer (4 000  $\mu\text{g}$  fer/l). Dans chaque tube, la couche inférieure contient du sérum antidiphthérique complexe 906 (concentration finale, 100 Lf/ml). La ligne principale visible en 1 ne correspond pas à la toxine, mais à un des antigènes accessoires (protéines P), comme le montre la figure 2. Il existe deux autres lignes, moins visibles sur le cliché. Avec un sérum à une zone, on n'observe qu'une ligne faible.

FIG. 2. — S. C. : sérum complexe (906), concentration 100 Lf/ml. S. P. : sérum à une zone, concentration 100 Lf/ml. 1, 2, 3, 4 comme sur la figure 1. Le filtrat 1 contient un antigène accessoire, donnant une réaction avec le sérum complexe et pas de réaction avec le sérum à une zone. Le filtrat 2 contient un antigène accessoire et une faible quantité de toxine.



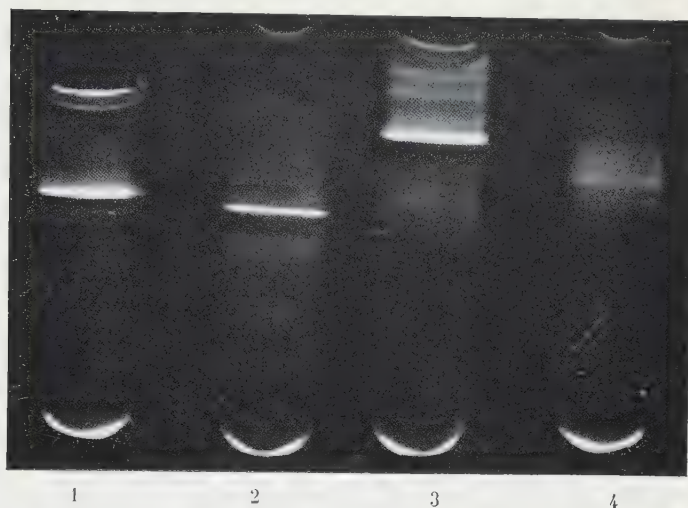


FIG. 1.

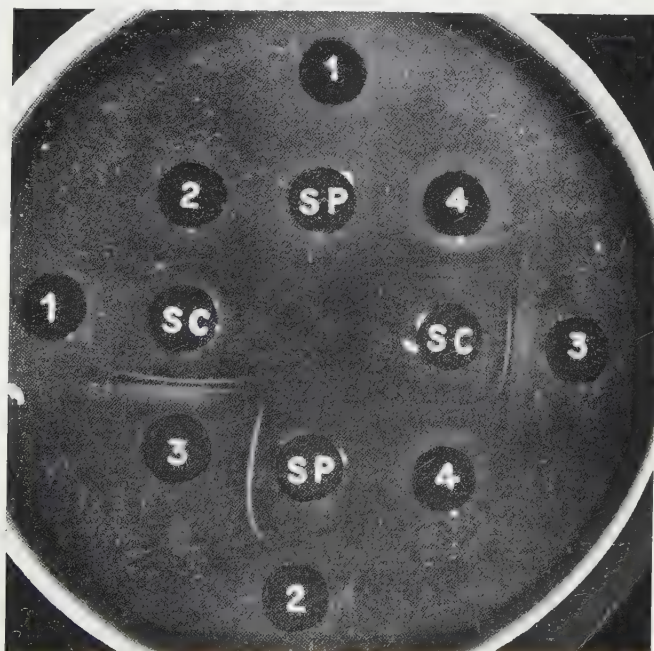


FIG. 2.



La culture entre alors très vite dans une phase de croissance ralentie et la phase exponentielle est très réduite ; d'où l'absence apparente de toxine pendant cette phase, absence qui paraît confirmée par le fait que la courbe : toxine en fonction du temps, extrapolée, ne passe pas par l'origine.

Les conclusions de Yoneda et Pappenheimer ne sont donc valables que dans les conditions particulières où se sont placés ces auteurs. Nous montrons ici qu'elles n'autorisent pas à étendre les conclusions qu'ils ont obtenues au cas général de la croissance en milieu optimum pour la toxinogénèse. Cependant, le taux de synthèse différentiel de la toxine est plus élevé pendant la phase de croissance ralentie que pendant la phase exponentielle.

De même, si l'on examine les chiffres de Mitsuashi et coll. [29] et que l'on établisse la courbe de croissance, on constate que pendant la phase de croissance exponentielle, le taux de toxine, comme dans nos expériences, était inférieur au seuil de détection par floculation. On ne peut conclure de ce résultat négatif, comme nous le montrons ici, à l'absence de synthèse de toxine diphtérique pendant cette phase.

La toxine sécrétée dans les premières phases de la croissance est par ailleurs bien identique, immunologiquement, à la toxine trouvée ultérieurement. Pour le vérifier, nous avons, dans des expériences parallèles, prélevé de grands volumes de filtrat de culture que nous avons concentrés par ultrafiltration.

PRÉLÈVEMENTS	CROISSANCE EN UNITÉS	CONCENTRATION RÉALISÉE
	KLETT AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT	
1 : 8 heures .....	240	100
2 : 10 heures .....	320	50
3 : 18 heures .....	1 000	20

L'ultrafiltrat 1 concentré cent fois donne avec le sérum à 1 zone une ligne nette. Il contient donc la toxine diphtérique. Testé avec un sérum complexe (sérum 906), il donne trois lignes distinctes (pl., fig. 1). Une d'entre elles correspond à une des protéines P de la figure 2 de la planche. L'échantillon 4 dans cette figure correspond au filtrat concentré d'une culture en excès de fer qui ne contient pas de toxine, mais seulement les protéines P' de Pappenheimer. On voit que certains des antigènes accessoires (antigènes diphtériques autres que la toxine) sont aussi sécrétés très précocement dans le milieu. On en voit déjà au moins 4 dans le prélèvement 3 (dix-huit heures). On note par ailleurs que l'antigène visible en 1 (huit heures) en boîte d'Ouchterlony est une des

protéines P. La toxine n'est visible qu'en tube d'Oakley (la technique en tube permettant de déceler les antigènes à des concentrations plus faibles que la technique Ouchterlony).

### CONCLUSIONS.

Sur milieu synthétique, avec une souche particulière, comme sur milieu complexe avec la souche Park Williams n° 8 Toronto, on peut réaliser des cultures agitées de bacille diphtérique donnant des taux appréciables de toxine. La culture présente, comme avec tous les germes, une phase exponentielle suivie d'une phase de ralentissement de la croissance. Cette dernière phase est relativement longue lorsque le bacille diphtérique est cultivé sur milieu optimum pour la toxinogénèse, c'est-à-dire sur un milieu où le taux de fer est modéré (ici, 150 µg de fer par litre).

La toxine diphtérique, de même que certains des antigènes accessoires [31] ou protéines P [30] est sécrétée dans le milieu très précocement, vraisemblablement dès le début de la croissance.

La formation de toxine se fait à la vitesse la plus élevée pendant la phase de ralentissement de la croissance. Il n'a pas été possible d'établir de relation mathématique simple entre la quantité de toxine synthétisée et la quantité de germes formés dans un temps donné.

La toxine ne s'accumule apparemment pas à l'intérieur des germes et sa concentration endocellulaire reste toujours faible, contrairement à ce que l'on observe dans le cas des toxines tétanique et botulinique [6].

La toxine diphtérique n'est donc pas libérée dans le milieu par l'autolyse des germes.

La synthèse de la toxine diphtérique semble donc être un phénomène complexe. La nécessité d'une carence relative du milieu de culture en fer est indiscutable et bien établie sur le plan expérimental. Le mécanisme exact de ce phénomène reste à préciser, de même que les relations entre la lysogénie pour un prophage particulier et la toxinogénèse.

### SUMMARY

#### DIPHTHERIA BACILLUS GROWTH AND TOXINOGENESIS IN AGITATED CULTURES, ON SYTHETIC MEDIA.

On synthetic media, with a particular strain, as on complex media with Toronto PWS strain, it is possible to realize agitated cultures of diphtheria bacilli yielding non negligible toxin titers. The culture presents, as any other culture, an exponential phase,

followed by a slow growth phase. This last phase is of relatively long duration when diphtheria bacillus is grown on an optimum medium, i. e. on a medium with a moderate iron concentration (150 µg/liter).

Diphtheria toxin, like certain secondary antigens or P proteins, is very early secreted into the medium, probably from the beginning of the growth.

Toxin formation is highest during the second growth phase (slow growth). It was not possible to state a simple mathematical relationship between the amount of synthesized toxin and the number of germs formed during a given time.

Toxin does not seem to accumulate within the germs, and its endocellular concentration remains always low, contrarily to what is observed with tetanus and botulism toxins.

Diphtheria toxin is not released into the medium by autolysis of the germs.

Diphtheria toxin synthesis seems to be a complex phenomenon. The necessity of a relative iron deficiency in the medium is unquestionable and has been experimentally proved. The exact mechanism of this phenomenon is still to be precised, as also the relationships between lysogeny for a particular prophage and toxinogenesis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LINGGOOD (F. V.). *Nature*, 1946, **157**, 264.
- [2] LINGGOOD (F. V.) et FENTON (E. L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 354.
- [3] LINGGOOD (F. V.). *Atti del VI Congresso Internaz. Microbiol.*, Rome, septembre 1953, **1**, 767.
- [4] LINGGOOD (F. V.), MATTHEWS (A. C.), PINFIELD (S.), POPE (C. G.) et SHARLAND (T. R.). *Nature*, 1955, **176**, 1128.
- [5] EDWARDS (D. C.). *Nature*, 1958, **182**, 190.
- [6] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), MANGALO (R.) et BIZZINI (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 599 et 1955, **88**, 24.
- [7] MARTIN (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, **12**, 26.
- [8] LOISEAU (G.) et PHILIPPE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1214.
- [9] RELYELD (E. H.), TURPIN (A.), LAFAILLE (A.), PARIS (C.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 301.
- [10] DREW (R. H.) et MUELLER (J. H.). *J. Bact.*, 1951, **52**, 549.
- [11] YONEDA (M.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. Bact.*, 1957, **74**, 256.
- [11 bis] YONEDA (M.). *Jap. J. Bact.*, 1950, **5**, 401.
- [12] YONEDA (M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 190.
- [13] OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1948, **25**, 186.
- [14] OUCHTERLONY (O.). *Lancet*, 1949, **2**, 346.
- [15] ALOUF (J.). *Trèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1958.
- [16] MUELLER (J. H.) et MILLER (P.). *J. Immunol.*, 1939, **37**, 103.
- [17] FISKE (C. H.) et SUBBAROW (Y.). *J. biol. Chim.*, 1925, **66**, 375.
- [18] JACKSON (S. H.). *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 1938, **10**, 302.



- [19] WOIWOOD (A. S.). *Biochem. J.*, 1947, **41**, 39.
- [20] MONOD (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 390.
- [21] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661 et 813.
- [22] JENSEN (C.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1933, *suppl.* 14.
- [23] JERNE (N. K.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1951, *suppl.* 87.
- [24] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
- [25] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
- [26] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115 et 1949, **228**, 1890 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109 ; *Methods in Med. Research*, 1952, **5**, 335.
- [27] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
- [28] OUCHTERLONY (O.). *Arkiv Kemi Min. Geol.*, 1948, **26 B**, 1 et 1950, **4**, 43 et 55 ; *Progress in Allergy*, 1958, **5**, 1.
- [28 bis] QUIGLEY (J. J.). *Am. J. Hyg.*, 1934, **20**, 218.
- [28 ter] RAMSHORST (J. D.). *Thèse ès sci.*, Utrecht, 1951.
- [29] MITSUASHI (S.), KUROKAWA (M.) et KOJIMA (Y.). *Japan J. exp. Med.*, 1949, **20**, 261 et 1951, **21**, 25.
- [30] LAWRENCE (H. G.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *Am. J. Hyg.*, 1948, **47**, 226. — COHN (M.) et PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. Immunol.*, 1949, **63**, 291.
- [31] RAYNAUD (M.). « Heterogeneity of diphtheria antitoxin ». *Henry Ford Hospital Intern. Symposium*, Detroit, 1958.

# RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES

## SUR LE FACTEUR ACTIVATEUR

### DE LA POLYARTHRITE CHRONIQUE ÉVOLUTIVE

par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG de ROSNAY  
et P. Du PASQUIER (\*).

(Laboratoire de Bactériologie  
de la Faculté de Médecine de Bordeaux)

Le « Facteur Activateur » présent dans le sérum des malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.) a surtout été étudié en tant que *facteur agglutinant*. On sait, en effet, depuis les travaux classiques de Waaler, de Rose, de Heller et de Svartz essentiellement, que le facteur est capable d'augmenter considérablement le pouvoir agglutinant d'un sérum humain vis-à-vis des hématies de mouton sensibilisées par un immunsérum. Plus récemment, les auteurs américains [1] ont montré que la réaction d'hémagglutination pouvait se faire avec des hématies humaines tannées et sensibilisées par de la globuline  $\gamma$ , qu'elle soit d'origine humaine ou animale.

Plus récemment encore, on s'est aperçu [2, 3] que l'on pouvait remplacer les hématies tannées par des *particules inertes* (colloïdion ou matière plastique) d'un diamètre convenablement choisi. La globuline  $\gamma$  peut se fixer à la surface de ces particules, et le système ainsi formé est agglutiné souvent à des taux remarquablement élevés par le sérum des malades atteints de P. C. E.

Il nous a paru intéressant de chercher à mettre en évidence le facteur activateur par des méthodes immunologiques plus directes, et en particulier par la méthode de double diffusion en gélose. Nous rapportons ici le détail de ces recherches qui, pour n'être encore que fragmentaires, n'en sont pas moins du plus haut intérêt, tant sur le plan pratique que théorique, et dont nous avons déjà donné le résumé dans une publication antérieure [4].

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.

## TECHNIQUE.

La réaction se pratique dans des tubes de verre bien calibrés de 100 mm de hauteur sur 6 mm de diamètre intérieur.

La gélose utilisée est une gélose aussi limpide que possible à la concentration de 0,6 p. 100, tamponnée à pH 6,8-7,00 et à laquelle on ajoute environ 1 p. 10 000 de merthiolate de soude.

Les sérums à étudier sont décomplémentés à 56° pendant une demi-heure et conservés congelés en présence de merthiolate s'ils ne sont pas utilisés immédiatement.

Comme « substance réactive », nous nous servons de globuline  $\gamma$ , soit tout simplement du sérum hémolytique de lapin anti-mouton que l'Institut Pasteur fournit pour les réactions sérologiques classiques (et que nous utilisons pour les réactions de Waaler et Rose), soit de  $\gamma$ -globuline purifiée selon la méthode de Cohn (cette  $\gamma$ -globuline a été très aimablement mise à notre disposition par M. le professeur Pautrizel, que nous remercions), soit de  $\gamma$ -globuline préparée par nous-mêmes au laboratoire, selon une technique personnelle [5] dérivée de celle de Horesji et Smetana et qui utilise la précipitation de certains constituants sériques par le rivanol, ou lactate de 2-éthoxy-6,9 diamino-acridine.

La marche de la réaction est la suivante :

a) On place dans le fond du tube, avec une pipette semi-capillaire, le sérum jusqu'à un trait de jauge situé à 2 cm du fond ;

b) On dépose à la surface du sérum de la gélose liquide à la température de 45° ou 50°, jusqu'à un second trait de jauge situé à 1 cm au-dessus du premier ;

c) Pendant que la gélose est encore semi-fluide, on dépose à sa surface la solution de  $\gamma$ -globuline jusqu'à un troisième trait de jauge situé à 2 cm au-dessus du précédent.

On a donc successivement une couche de sérum de 2 cm, une couche de gélose de 1 cm, une couche de globulines  $\gamma$  de 2 cm. Nous n'insisterons pas sur les multiples précautions techniques dont il faut s'entourer. Rappelons, toutefois, qu'il est indispensable d'enduire la surface intérieure du tube d'un film de gélose que l'on laisse sécher avant de passer à toute autre opération.

Les tubes ainsi préparés sont recouverts, pour éviter l'évaporation et les souillures, et l'on observe toutes les vingt-quatre heures l'apparition éventuelle de bandes de précipitation dans la couche de gélose. La rapidité d'apparition de ces bandes, leur nombre, leur position initiale et le sens de leur migration sont autant de facteurs intéressants qui sont, pour une bonne part, sous la dépendance des concentrations respectives du sérum et de la solution de globuline  $\gamma$ .

## RÉSULTATS.

Nous avons étudié par cette méthode le sérum de 49 sujets, dont 36 étaient atteints de P. C. E., les 13 autres étant soit en bonne santé, soit atteints de dysglobulinémie plus ou moins importante et portant essentiellement sur la fraction  $\gamma$ .

La réaction classique de Waaler-Rose (W.-R.), selon la modification de Heller et de Svartz, et le test au latex, selon une technique personnelle [6], ont été pratiqués sur tous les sérums étudiés. Dans 15 cas, nous avons effectué, également, des réactions de précipitation interfaciale, selon la méthode décrite par Epstein [7].

a) Nos premiers essais concernent 10 sérums de P. C. E. ayant des titres allant :

Du 1/16 au 1/256 pour la réaction de W.-R. ;

Du 1/40 au 1/2 560 pour le test au latex.

Dans cette série, nous avons utilisé le sérum non dilué et l'avons testé contre le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur dilué au 1/10. Nous avons obtenu sept fois sur dix des bandes de précipitation, apparaissant entre la quarante-huitième et la cent vingtième heure. Trois fois, l'on put observer une bande isolée, une fois deux bandes, trois fois trois bandes apparurent successivement. Dans trois cas, il n'y eut aucune précipitation après une observation de dix jours. Ajoutons que trois sérums normaux ne donnèrent lieu à aucune bande de précipitation.

b) Onze sérums de P. C. E. (réaction W.-R. de 1/64 à 1/256, réaction au latex de 1/40 à 1/2 560) furent éprouvés par rapport à la  $\gamma$ -globuline purifiée (méthode de Cohn). Le sérum fut utilisé pur ou dilué au 1/2 dans du sérum physiologique merthiolaté, la  $\gamma$ -globuline à la concentration de 3 mg au millilitre. Dans ces 11 cas, nous avons eu 11 résultats positifs : neuf fois une bande de précipitation ; une fois deux bandes de précipitation ; une fois trois bandes de précipitation.

c) Quinze sérums de P. C. E. (réaction de Waaler-Rose allant de 1/32 à 1/512, test au latex de 1/20 à 1/2 560) furent testés contre une solution de  $\gamma$ -globuline préparée par la méthode au rivanol, à la concentration de 3 mg au millilitre. Le sérum fut utilisé pur. Nous avons obtenu 3 résultats négatifs et 12 résultats positifs : neuf fois une bande de précipitation ; trois fois deux bandes de précipitation.

d) Dix sérums de sujets indemnes de P. C. E. et présentant une réaction de W.-R. et un test au latex négatifs, mais des troubles importants de la répartition des globulines à l'électrophorèse. furent testés contre de la  $\gamma$ -globuline purifiée par le rivanol (concentration de 3 mg au millilitre). Nous avons obtenu huit fois un résultat négatif et deux fois apparut une bande de précipitation après cinq jours d'observation (un rhumatisme articulaire aigu et une syphilis tertiaire).

e) Dans 15 cas pris parmi les précédentes séries, nous avons pratiqué une réaction de précipitation selon Epstein en mettant au contact, dans des tubes capillaires, le sérum du malade non

dilué et une solution de  $\gamma$ -globuline purifiée par le rivanol à la concentration de 3 mg au millilitre. Une réaction positive se traduit par l'apparition rapide (une heure environ à la température de la pièce) d'une bande de précipitation à l'interface, qui sédimente au fond du tube en vingt-quatre heures.

Dans 11 cas de P. C. E., nous avons eu 10 réactions positives.

Chez 4 malades indemnes de P. C. E., nous avons eu une réaction positive (le malade atteint de rhumatisme articulaire aigu cité plus haut).

#### DISCUSSION.

De ces travaux, encore très fragmentaires, on peut tirer quelques enseignements.

1° La réaction de Waaler-Rose, le test au latex et les réactions de précipitation sont *en étroite concordance*. Sur 36 sérums de malades atteints de P. C. E., nous avons eu au total : 34 réactions de Waaler-Rose positives ; 34 tests au latex positifs ; 30 réactions de précipitation en gélose positives.

La réaction de précipitation semble à priori moins sensible que les réactions d'agglutination.

2° Nous n'avons pas encore pu mettre en évidence de relation entre le taux de positivité des réactions d'agglutination et le nombre des bandes de précipitation ou leur rapidité d'apparition. Par ailleurs, si l'on dilue le sérum, la réaction devient très rapidement négative, en général après une dilution au 1/4. Tout ce que l'on peut dire, c'est que les sérums ayant un taux agglutinant très élevé donnent, le plus souvent, des bandes de précipitation qui migrent rapidement dans la couche de gélose et dans le sens sérum  $\rightarrow$   $\gamma$ -globuline.

3° Ces constatations suggèrent fortement que le phénomène exploré par la réaction de Waaler-Rose classique, par le test au latex et par les réactions de précipitation, est le même et *qu'il s'agit d'un phénomène immunologique* dans lequel la  $\gamma$ -globuline (ou le sérum hémolytique) jouerait le rôle d'antigène. Les travaux de Epstein et coll. [7] plaident en faveur de cette conception.

Il est évidemment tentant, pour se faire une idée plus précise, d'étudier le comportement du *complément* en présence d'un mélange de  $\gamma$ -globuline et de sérum de P. C. E. En utilisant une réaction de fixation du complément selon Kolmer, l'antigène étant représenté par de la globuline  $\gamma$ , nous avons eu jusqu'à maintenant des résultats très irréguliers et d'interprétation difficile. Dans quelques cas, cependant, il semble que nous ayons obtenu une fixation du complément à un taux significatif. Nous poursuivons nos recherches sur ce point.



## RÉSUMÉ.

Les auteurs ont appliqué les méthodes de diffusion en gélose à l'étude de la polyarthrite chronique évolutive. Leurs expériences ont été effectuées selon la technique en double diffusion. Elles ont porté sur un système immunologique composé, d'une part, d'une solution de  $\gamma$ -globuline humaine jouant le rôle d'antigène et, d'autre part, de sérum de malades présentant les stigmates cliniques et biologiques de la polyarthrite chronique évolutive. Dans 80 p. 100 des cas environ, il apparaît, en vingt-quatre ou quarante-huit heures, une ou plusieurs bandes de précipitation. Leur position par rapport à la zone sérum et leur déplacement à partir de leur position initiale semblent varier en fonction du taux de positivité du sérum à la réaction de Waaler-Rose classique. Des sérums témoins, prélevés chez des rhumatisants chroniques ne présentant pas de polyarthrite chronique évolutive, n'ont pas donné de bandes de précipitation.

Ces faits semblent confirmer les recherches antérieures des auteurs, qui ont étudié le système «  $\gamma$ -globuline-sérum de polyarthrite chronique évolutive » par diverses méthodes : a) agglutination de particules inertes selon une modification personnelle de la technique de Singer ; b) précipitation interfaciale en milieu liquide.

Il semble bien que l'ensemble de ces techniques mette en évidence une réaction antigène-anticorps authentique.

Une réaction de fixation du complément selon Kolmer, utilisant le même système immunologique, est en cours d'étude.

## SUMMARY

IMMUNOLOGIC STUDIES ON THE ACTIVATING FACTOR  
IN RHEUMATOID ARTHRITIS.

The authors have applied the double gel diffusion technique to the study of rheumatoid arthritis. The experiments have been carried out with an immunological complex constituted of a human  $\gamma$ -globulin solution as antigen, and sera of patients presenting the clinical and biological symptoms of rheumatoid arthritis. In about 80 % of the cases, one or several lines of precipitation appear within 24 to 48 hours. Their situation in relation to the serum zone and their shift from their initial position seem to vary according to the positivity rate of the serum towards the classical Waaler-Rose reaction.

Control sera taken from patients suffering from chronic rheumatism but not presenting rheumatoid arthritis, gave no line of precipitation.

These facts seem to confirm the previous findings of the authors, who have studied the  $\gamma$ -globulin-rheumatoid arthritis serum complex by means of different methods :

a) Agglutination of inert particles following a personal modification of Singer's technique.

b) Interfacial precipitation in liquid medium.

It seems that all these techniques demonstrate an actual antigen-antibody reaction.

A complement fixation reaction (Kolmer) with the same immunological complex is being studied.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HELLER (H.), JACOBSON (A. S.), KOLODNY (M. H.) et KAMMERER (W. H.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 66.
  - [2] SINGER (M.) et PLOTZ (C. M.). *Am. J. Med.*, 1956, **21**, 888.
  - [3] RHEINS (M. S.), COY (F. W. Mc), BURRELL (R. G.) et BUEHLER (E. V.). *J. Lab. clin. Med.*, 1957, **50**, 113.
  - [4] MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.) et DU PASQUIER (P.). *Résumés de travaux présentés au V<sup>e</sup> Congrès Int. Microbiol.*, Stockholm, août 1958, p. 160-161. G. Tunevall, édit., Upsala, 1958.
  - [5] DULONG DE ROSNAY (Ch.) et DU PASQUIER (P.). *Ann. Biol. clin.*, 1958, **16**, 363.
  - [6] DULONG DE ROSNAY (Ch.), DU PASQUIER (P.) et MOUSTARDIER (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 23.
  - [7] EPSTEIN (W.), JOHNSON (A.) et RAGAN (Ch.). *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1956, **91**, 235.
-

# PRÉSENCE DANS LES IMMUNSÉRUMS ANTI-BACTÉRIENS DE FACTEURS ANTI-GLOBULINIQUES ANALOGUES A CEUX DE LA POLYARTHRITE CHRONIQUE ÉVOLUTIVE

par A. EYQUEM, N. GUYOT-JEANNIN et L. PODLIACHOUK (\*).

*(Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie  
et des Groupes sanguins)*

Il existe dans le sérum de certains malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.), une macro-globuline, dont les caractères sérologiques ont été précisés [6, 7, 8]. Cette protéine est capable de se combiner avec les complexes antigène-anticorps ; elle est notamment révélabale à l'aide de globules rouges sensibilisés par un immunosérum de lapin. Cette macro-globuline a une constante de sédimentation  $S_{20}^w$  de 22, elle est dissociable en deux composants de constante 19 S et 7 S [5]. Elle possède aussi la propriété de se combiner avec la globuline d'origine humaine, fraction F II de Cohn ; cette combinaison peut être révélée par la réaction de précipitation (Epstein) ou d'hémagglutination passive [4], en fixant la globuline sur les globules rouges tannés [3, 6, 7]. Cette dernière réaction est très sensible et permet de déceler une activité dans le sérum de P. C. E. dilué souvent au 1/800 ou à 1/3 200.

Le mode de formation et l'étiologie de cette macro-globuline restent inconnus. Certaines des observations que nous avons faites nous permettent d'envisager une hypothèse. En effet, les différents échantillons de fractions F II obtenus par la méthode 6 + 9 de Cohn, ne sont pas tous directement utilisables dans la réaction sérologique. Certains fournissent des résultats qualitativement satisfaisants en étant mis simplement en dilution, tandis que d'autres, fixés sur les globules tannés, dans les mêmes conditions, sont absolument inaptes à déceler une anomalie quelconque dans le sérum de P. C. E. Par contre, ils le peuvent, au moins pour certains d'entre eux, après chauffage

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

pendant trente minutes à 63° ou même à 56°, ou encore après traitement par le formol. Il convient de remarquer que la qualité de l'agglutination est parfois un peu différente de celle observée avec les échantillons de globulines réagissant sans traitement préalable. Les principaux échantillons de globuline étudiés réagissant sans traitement préalable sont les suivants :

- 1° Fourni par la Croix-Rouge Néerlandaise (en 1954),
- 2° Harvard Medical School Boston, échantillon identique à celui étudié par Heller [6],
- 3° Squibb 601 et 606,
- 4° Squibb 658,
- 5° Protein Foundation 1014.

Lors de notre séjour à la Protein Foundation, nous avons étudié systématiquement un nombre important d'échantillons de fractions II, obtenus chaque semaine à partir du plasma de sang fraîchement prélevé, et nous avons pu constater l'absence de réactivité de ces échantillons ; seul l'échantillon 1014 nous a donné des résultats satisfaisants. Cet échantillon provenait du fractionnement d'un lot de plasma qui avait été conservé à 4°, pendant une douzaine de semaines environ.

Les échantillons 601 et 606 de Squibb, étudiés indépendamment par nous-mêmes [3] et Kunkel [5], ainsi que par Singer et Plotz [12] fournissaient des résultats aussi nets sans traitement préalable. Ils étaient inaptes à l'utilisation thérapeutique. On pouvait donc se demander si ces échantillons n'avaient pas été soumis à une contamination bactérienne, au cours de leur manipulation. Ils pouvaient ainsi mettre en évidence un anticorps anti-bactérien, existant dans le sérum de P. C. E., peut être différent du facteur de Waaler-Rose.

Si la réaction était attribuable à une contamination bactérienne, on devrait mettre en évidence sa positivité dans le sérum d'autres malades ; or, parmi ceux ayant donné un résultat positif, nous n'avons trouvé que des lupus érythémateux et quelques cancéreux. (Notons qu'il n'y a qu'un nombre relativement limité de malades qui possèdent un anticorps vis-à-vis de globules rouges tannés.)

Pour préciser l'éventuelle contamination bactérienne, nous pouvions effectuer deux séries d'expériences :

1° Absorber le facteur de Waaler-Rose à l'aide de différentes bactéries ou antigènes bactériens, mais la spécificité des résultats pouvait être critiquée, car l'absorption du facteur pouvait être secondaire à une première sensibilisation par un anticorps spécifique.

2° Nous pouvions, au contraire, plus facilement rechercher la présence dans le sérum de différents lapins, immunisés à l'aide

d'antigènes bactériens, l'existence de l'anticorps se combinant avec les globulines, par la réaction d'hémagglutination passive.

Nous avons ainsi examiné : 190 lapins, 45 chevaux, 10 bœufs, 12 chiens.

Parmi les immunosérums de lapin, nous avons :

Lapin anti-*Salmonella* (D<sup>r</sup> Le Minor).

Lapin anti-pneumocoque.

Lapin anti-staphylocoque (D<sup>r</sup> Pillet).

Lapin anti-streptocoque (D<sup>r</sup> Wahl).

Lapin anti-anaérobie (D<sup>r</sup> Prévot).

Ces deux derniers groupes nous ont fourni des résultats inattendus. En effet, le sérum de lapins ayant reçu des injections de suspension de streptocoques présente une substance réagissant, par hémagglutination passive, avec l'échantillon 1014 de globuline (tableau I).

TABLEAU I. — Réactions d'hémagglutination passive obtenues avec le sérum de lapins anti-streptocoque A et la globuline 1014.

N <sup>o</sup>	TITRES									
	7	14	28	56	112	224	450	900	1800	3600
694	++++ —	++++ —	++++ —	+++ —	+++ —	+	+	+	+	
795	++++ —	++++ —	++++ —	++ —	++ —	++	+	+	+	+
803	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	++ —	++				
961	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	+++ —	+++	+++	+++	+++	+++
962	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	+++	+++	+++	++	++
974	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++	++	++	++	++
988	++++ +	++++ +	++++ —	+++ —	+++ —	+	+			
987	— —	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
990	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	+++	+++	+++	—
993	— —	— —	— —	— —	— —	—	—	—	—	—
994	+++ —	+++ —	+++ —	+	—	—	—	—	—	—
789 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	++	++	—	—
791 R	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	+++ —	++	—	—	—	—
796 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	++++	++	++	—	—
797 R	++++ —	++++ —	++++ —	++++ —	—	—	—	—	—	—
798 R	++ —	++ —	++ —	++ —	++ —	++				

Elle se retrouve avec d'autres échantillons de globulines (601, 606) réagissant sans traitement préalable avec le sérum de P. C. E. On pourrait donc penser à une contamination des globulines par une bactérie ayant une communauté antigénique avec



TABLEAU II. — Comparaison de l'activité du sérum de lapins anti-streptocoque A vis-à-vis de deux types de globuline  $\gamma$ .

gib. $\gamma$ 1014	TITRES						gib. $\gamma$ Bern chauffé	TITRES												
	7	14	28	56	100	200		400	800	1600	3200	7	14	28	56	100	200	400	800	1600
537	+++ —	+++	++	++	+			537	+++ —	+++	+									
566	—							566	—											
569	++ +	++	+					569	+	+										
571	—							571	+											
684	+++ ++	+++ ++	+++ +	+++	+++	+++	++	684	+++ ++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
685	+++ —	+++	+++	+++	+++	++	++	685	+++ —	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
737	+++ —	+++	+++	+++	+++	++	+	737	+++ —	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
755	+++ —	+++	+++	++	++			755	+++ —	+++	+++	++	++	++	++					
756	+++ +++	+++	+++	+++	++			756	+++ ++	+++	+++	++	++	+						
757	+++ —	+++	++	++				757	+++ —	+++	+++	+++	++	+						
759	++ ++	+	+					759	++ +	++	++									
800	+++ —	+++	+++	+++	++			800	+++ —	+++	+++	++	++	+						
807	—							807	+	+										
808	++ —	+	+++	+				808	++ —	++	++									
839	+++ —	++++	+++	+++	+++	+++	++	839	+++ —	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
573	—							573	—											
595	—							595	—											

(Pour chaque sérum, deux séries de résultats sont indiquées : à la ligne supérieure vis-à-vis de G. R. tannés et sensibilisés, et à la ligne inférieure vis-à-vis de G. R. tannés non sensibilisés.)

le streptocoque ; mais, fait important, la réaction se produit aussi vis-à-vis de la globuline suisse (aimablement fournie par M. Hassig) et soumise au chauffage à 56° pendant trente minutes (tableau II), ou encore la globuline de la Croix-Rouge hollandaise ou un échantillon « R » très particulier (fourni par M. Grabar).

Le facteur mis en évidence dans le sérum de lapins anti-streptocoques apparaît après une immunisation de cinq semaines ayant comporté 15 injections. Il se retrouve à peu près exclusivement chez les lapins immunisés avec le streptocoque hémolytique A et notamment les types antigéniques suivants : 1, 2, 3, 5, 6, 8, 13, 18, 19, 23, 24, 26, 36 et 46.

Nous ne l'avons pas encore décelé après immunisation vis-à-vis des types 12, 14, 27, 28, 31.

Il convient de noter que, parmi les lapins d'une même série, immunisés suivant le même rythme et dans les mêmes conditions vis-à-vis du même type antigénique, tous ne sont pas capables d'élaborer le facteur.

Les antigènes streptococciques de groupe ne semblent pas responsables de cette immunisation : les immunsérums de lapins anti-B, E, F, H, K, L, O, P, Q nous ont fourni des résultats négatifs. Seul le groupe C nous a donné un résultat positif.

Le facteur anti-globulinique est indépendant des anticorps anti-streptococciques spécifiques.

L'examen de 7 bovins anti-streptococciques A nous a montré, chez trois d'entre eux, l'existence d'un facteur agglutinant de manière qualitativement différente, il est vrai, les globules sensibilisés par la globuline  $\gamma$ .

Le même facteur se retrouve dans le sérum de lapin immunisé vis-à-vis de bactéries anaérobies, notamment *Corynebacterium pyogenes*, *liquefaciens* ou *diphtheroides*, ou encore *Sphero-phorus pseudo-necrophorus*, *ridiculosus* ou *Fusiformis biacutus* (tableau III).

Il faut remarquer de même, que pour les sérums anti-streptocoques, tous les lapins d'une même série, soumis au même protocole d'immunisation n'élaborent pas le même facteur. Dans le cas des lapins anti-anaérobies, l'anti-globuline est décelable avec les globulines 1014, 601 et 606, non chauffées ainsi que les globulines suisses, hollandaises ou R chauffées à 56° pendant trente minutes. Le facteur anti-globulinique n'est pas décelable vis-à-vis de ces mêmes échantillons non chauffés.

Pour certains sérums possédant un titre d'anti-globuline important à la réaction d'hémagglutination, on observe une réaction de précipitation interfaciale, avec constitution du précipité.

Dans la majorité des cas, la réaction de Waaler-Rose modifiée s'est révélée négative lorsqu'elle a été pratiquée à l'aide de glo-

TABLEAU III. — Réactions d'hémagglutination passive obtenues avec le sérum de lapins anti-streptocoque (B, E, H, K, L, P, Q) et de bovins anti-streptocoque A, vis-à-vis de la globuline 1014.

		TITRES									
		7	14	28	56	112	224	450	900	1800	3600
LAPINS ANTI-STREPTO.	B	—	+	±	+	—	—	—	—	—	—
	C	++++	++++	++++	—	++	+	+	—	—	—
	E	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	H	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	L	±	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	O	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	P	+++	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—
	Q	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—
BOVINS ANTI-STREPTO. A	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	31	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	88	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	89	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	91	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
	91	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

bules rouges humains sensibilisés par un sérum de lapin anti-homme. Elle est, par contre, positive dans un tiers des cas vis-à-vis de globules rouges de mouton sensibilisés par un anti-sérum de lapin. Ceci peut être attribué à une absorption du facteur lors de l'élimination des agglutinines anti-homme réalisée préalablement à l'examen des sérums de lapins.

Le facteur anti-globulinique du sérum des lapins anti-streptococciques est aussi décelable par les globulines de bœuf, de porc (fraction II de Armour), comme l'est celui des P. C. E., ainsi que par les globulines de lapins obtenues par fractionnement à l'aide de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  par agglutination de particules de latex sensibilisées.

L'ultracentrifugation du sérum de certains lapins, à 40 000 *g* pendant trois heures effectuée comparativement à celle du sérum de P. C. E., réalise une certaine concentration du facteur dans les couches inférieures du tube.

La mise en évidence, chez les lapins immunisés, de ce facteur

anti-globulinique, suggère de nombreuses hypothèses. On doit tout naturellement le rapprocher de l'immuno-conglutinine qui, selon Coombs [2] doit être considérée comme un anticorps anti-complément ; son activité se limiterait à un complément adsorbé sur un complexe antigène-anticorps, notamment chez des animaux immunisés vis-à-vis de bacilles Gram-négatifs et soumis à une stimulation suffisamment intense. Le complément subirait, après fixation sur le complexe antigène-anticorps, une modification de l'immuno-conglutinine. Ce facteur ne semble pas identique aux anticorps décrits antérieurement [9, 10].

Le facteur anti-globulinique pourrait donc ne réagir qu'avec les groupements de la globuline rendus apparents au cours de la préparation de certains échantillons ou démasqués par le chauffage à 56°. La comparaison de l'activité des hétéro-immunsérums anti-globuliniques et des facteurs permet de penser que ces derniers ne réagissent qu'avec une partie des groupements antigéniques, car la réaction n'est obtenue que lorsqu'une forte quantité de globuline est fixée sur les globules rouges tannés.

Ainsi les facteurs anti-globuliniques, mis en évidence dans les immunsérums anti-bactériens, permettent de supposer que ce type d'immunisation faisant intervenir les antigènes streptococciques ou des bactéries anaérobies pourrait être à l'origine de la formation d'une macro-globuline, au cours de la P. C. E.

#### CONCLUSION.

Il existe, au cours de la P. C. E., un facteur décelable à l'aide de certaines globulines (fractions F II) ; sans traitement préalable, ce même facteur peut être mis en évidence à l'aide d'autres globulines soumises au chauffage à 63° ou à 56°.

Le sérum de certains lapins immunisés à l'aide de streptocoques, de différents types antigéniques ou de bactéries anaérobies pendant plus de trois semaines, possède un facteur anti-globulinique ayant des caractères analogues à ceux observés dans la P. C. E. Il est parfois associé à un facteur de Waaler-Rose.

Ce facteur anti-globulinique réagit avec les globulines d'origine spécifique différente.

#### SUMMARY

##### PRESENCE IN ANTI-BACTERIAL SERA OF ANTI-GLOBULINIC FACTORS RESEMBLING THOSE OF RHEUMATOID ARTHRITIS.

The serum of patients suffering from rheumatoid arthritis contains a factor which can be demonstrated by means of certain F II globulin fractions. This factor can be demonstrated by means of other globulins heated to 63° or 56°.

The serum of certain rabbits which have been immunized during more than three weeks with : a) different types streptococci ; b) anaerobic bacteria, contains an anti-globulin factor, possessing properties resembling those of rheumatoid arthritis sera ; this factor is sometimes associated with the Waaler-Rose factor. This anti-globulin factor reacts with globulins of various species.

★★

Nous tenons à remercier, pour nous avoir fourni différents échantillons de globuline, le D<sup>r</sup> S. Gibson (Am. Red. Cross), le D<sup>r</sup> Pennell (Protein Foundation Harvard), le médecin général Julliard (C. T. R. A.), le D<sup>r</sup> Van Loghem, le D<sup>r</sup> Hassig, le D<sup>r</sup> J.-P. Soulier ; pour les immunsérums de lapins, nos collègues les D<sup>rs</sup> Wahl, Prévot, Pillet et Le Minor. Les sérums de malades atteints de rhumatismes inflammatoires chroniques nous ont été confiés par le D<sup>r</sup> F. Jacqueline.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BORDUAS (A.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 34.
  - [2] COOMBS (A. M.) et COOMBS (R. R. A.). *J. Hyg.*, 1953, **51**, 509.
  - [3] EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.) et JACQUELINE (F.). *VI<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hémat.*, Karger, édit., 1958, 900.
  - [4] EYQUEM (A.), GUYOT-JEANNIN (N.) et PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.). *Colloque Immunopathol. Seelisberg*, 1958 (*sous presse*).
  - [5] FRANKLIN (E. C.), HOLMAN (H. R.), MÜLLER-EBERHARDT et KUNKEL (H. G.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 425.
  - [6] HELLER (G.), JACOBSON (A. S.), KOLODNY (M. H.) et KAMMERER (W. H.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 66.
  - [7] JACQUELINE (F.), EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.). *Rev. Rhum.*, 1957, **24**, 385.
  - [8] JOCHEM (E.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 625.
  - [9] LILLE-SZYSZKOWICZ (I.) et GULMANTOWICZ (A.). *Vox sang.*, 1958, **3**, 100.
  - [10] MILGROM (F.) et DUBISKI (S.). *Nature*, 1957, **179**, 1351.
  - [11] PODLIACHOUK (M<sup>me</sup> L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **94**, 659.
  - [12] SINGER (J. M.) et PLOTZ (C. M.). *Am. J. Med.*, 1956, **21**, 888.
-



# ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES *SALMONELLA*

## V. — RÔLE DE QUELQUES SUCRES, ET EN PARTICULIER DES 3-6 DIDÉSOXYHEXOSES, DANS LA SPÉCIFICITÉ DES ANTIGÈNES O DU TABLEAU DE KAUFFMANN-WHITE (\*)

par A. M. STAUB, R. TINELLI, O. LÜDERITZ et O. WESTPHAL (\*\*)  
(avec la collaboration technique de B. LELUC).

(Service des Vaccins, Institut Pasteur, Paris,  
et Wander Forschungsinstitut, Freiburg, Allemagne)

Au cours de ces derniers mois, nous avons montré l'existence dans les *Salmonella* de quatre nouveaux sucres (didésoxyhexoses) : au tyvélose [31, 41] et à l'abéquose [32, 41] découverts précédemment se sont ajoutés, en effet, deux autres sucres nouveaux que nous avons appelés paratose [6, 8] et colitose [25]. Dans un travail en collaboration avec M. Lederer, M<sup>mes</sup> Fouquet et Polonsky et M. Stirm, la nature exacte de ces quatre sucres a été déterminée et la synthèse de certains réalisée [7, 8]. Nous voudrions montrer dans ce travail le rôle de ces sucres, ainsi que celui du glucose et du rhamnose dans la spécificité des antigènes (1) O de Kauffmann-White auxquels ils appartiennent. L'utilisation des deux techniques de l'inhibition spécifique, qui permet de déterminer le sucre terminal d'une chaîne polyosidique, et de la précipitation croisée par des polyosides de constitution connue, avait déjà permis d'apporter les premières notions sur la structure chimique des antigènes 9 et 12 de *S. typhi* [36]. Nous avons appliqué les mêmes techniques dans ce travail, dans lequel nous avons repris l'étude des antigènes 9 (présent dans les *Salmonella* du groupe D) et 12 (présent dans les *Salmonella* des groupes A, B et D) en utilisant d'autres sérums, et où nous avons abordé celle des antigènes 1 (présent dans certaines *Salmonella* des groupes A,

(\*) Une partie des résultats publiés dans ce mémoire a fait l'objet de trois communications aux Congrès de Stockholm et de Vienne [36 a].

(\*\*) Manuscrit reçu le 12 novembre 1958.

(1) Bien que l'on sache [33] que les « antigènes » de Kauffmann-White peuvent être en réalité des groupements déterminants portés par une même molécule, nous continuons à utiliser cette appellation courante.

B et E<sub>4</sub>), 2 (présent dans les *Salmonella* du groupe A), 4 (présent dans les *Salmonella* du groupe B), 8 (présent dans les *Salmonella* du groupe C<sub>2</sub>) et 35 (présent dans les *Salmonella* du groupe P et *E. coli* O 111 : B<sub>4</sub>).

Le tableau I indique les *Salmonella* utilisées dans chaque groupe, les antigènes O de Kauffmann-White qu'elles contiennent et les sucres présents dans les polysides spécifiques qui ont servi pour cette étude ; ces polysides portent des groupes déterminants responsables en grande partie de la spécificité des antigènes O [34].

TABLEAU I. — Caractéristiques immunologiques et chimiques des germes utilisés pour cette étude.

Groupe	Salmonella	Antigènes O (de KAUFF- MANN-WHITE) (x)	Sucres présents dans le polyoside							
			Hexoses			6 Dés- oxy- hexoses	3-6 Didés- oxy- hexoses			
			Galactose	Glucose	Mannose		Rhamnose	Abéquose	Colitose	Paratose
A	S.paratyphi A " var.durazzo	1, <u>2</u> , 12 <u>2</u> , 12	+	+	+	+			+	
B	S.paratyphi B S.typhi murium	1, <u>4</u> , 5, 12 (1) <u>4</u> , 12	+	+	+	+		+		
C <sub>2</sub>	S.newport	6, <u>8</u>	+	+	+	+		+		
D	S. typhi	<u>9</u> , 12	+	+	+	+				+
E <sub>4</sub>	S. niloese	1, 3, <u>19</u>	+	+	+	+				
P	S. adelaide	<u>35</u>	+						+	
E. coli 0 11f B <sub>4</sub>			111	+	+				+	

(x) = Les chiffres soulignés représentent les antigènes spécifiques de chaque groupe.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

SOUCHES. — Les souches suivantes proviennent du Centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur, où elles sont conservées sur milieu à l'œuf (milieu de Dorset [*in* 3]). Elles ont été entraînées avant chaque récolte par un passage en bouillon de viande et un passage sur gélose nutritive suivi d'un isolement.

*S. typhi* : souche T35-52 isolée à l'Institut Pasteur, ne contenant que l'antigène O ;

*S. paratyphi* B : souche du Centre International des *Salmonella* n° 8006.

*S. typhi murium* : 2-56, souche isolée à l'Institut Pasteur.

*S. paratyphi* A : 205, variante aflagellée de l'Institut Pasteur.

*S. adelaide* : souche du Centre International des *Salmonella*.

Les autres souches de *Salmonella* provenaient du N. C. T. C. de Londres et portaient les numéros suivants :

*S. paratyphi* A var. *durazzo* N. C. T. C. 3175.

*S. newport* N. C. T. C. 3751

*S. niloese* N. C. T. C. 5 789.

La souche de *E. coli* O 111 : B4 provenait du Centre International des *Salmonella* de Copenhague.

SÉRUMS. — Nous avons utilisé des sérums de cheval et de lapin préparés suivant le protocole indiqué par Staub et Davarpanah [34]. Tous les chevaux ont reçu deux séries de 8 injections bihebdomadaires, séparées par un intervalle de quarante-cinq jours. Les lapins ont reçu 2 ou 3 séries de 8 injections à raison de 4 par semaine, à un mois d'intervalle. Les sérums de lapin sont toujours des mélanges de sérums provenant de 3 à 6 animaux.

POLYOSIDES. — Les polyosides de *S. typhi*, *S. paratyphi* B, *S. typhi murium*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* A var. *durazzo* et *S. adelaide* ont été extraits par hydrolyse acétique des germes (cultivés sur gélose nutritive, lavés et séchés par l'acétone), puis purifiés suivant la technique de Freeman [40], dialysés et lyophilisés. Les précipitations préconisées par Freeman (6 précipitations alcooliques fractionnées entre 1 et 6 volumes ; 3 précipitations par l'acide acétique glacial de 94 à 98 p. 100 suivant les polyosides ; 3 dernières précipitations alcooliques entre 1 et 6 volumes) nous ont donné de bons résultats pour les polyosides des quatre premières *Salmonella*. Avec les polyosides extraits de *S. adelaide* et *S. paratyphi* A var. *durazzo*, la précipitation acétique entraînant des pertes du polyoside, nous n'avons procédé qu'à deux (var. *durazzo*) et même une seule précipitation (*adelaide*).

Les polyosides de *S. niloese* et de *S. newport* nous ont été donnés par D. A. L. Davies. Ils avaient été préparés à partir de l'antigène somatique et n'avaient pas été hautement purifiés [5]. Nous avons employé tel quel le polyoside de *S. niloese*. Le polyoside de *S. newport* a été purifié suivant la technique exacte de Freeman [40].

Le polyoside de *E. coli* a été préparé à partir du lipopolyoside extrait des germes par le mélange phénol/eau à chaud [40]. Après hydrolyse par l'acide acétique normal pendant une heure à 100°, le polyoside a été précipité par l'alcool, dialysé puis lyophilisé.

INHIBITION SPÉCIFIQUE. — Nous avons suivi exactement la technique décrite par Staub et Tinelli [36] en utilisant 4 mg de chaque 3-6 di-désoxyhexose et 40 mg des autres sucres. Toutefois, au lieu d'utiliser toujours 0,5 cm<sup>3</sup> de sérum, nous avons choisi pour chaque sérum la

quantité contenant environ 100  $\mu\text{g}$  d'azote précipitable par le polyside au maximum de la précipitation, et nous avons utilisé la quantité de polyside nécessaire et suffisante pour précipiter cette quantité d'anticorps.

AGGLUTINATION. — Nous avons utilisé la technique classique : 0,9  $\text{cm}^3$  de suspension O ( $5 \times 10^8$  germes tués par l'alcool à 50 p. 100) et 0,1  $\text{cm}^3$  de dilutions de sérum allant du 1/10, 1/20, 1/40... jusqu'à 1/2 500. La lecture a été faite après centrifugation. Le titre est indiqué par l'inverse de la dilution la plus forte donnant une agglutination nette ou suspecte ( $\pm$ ). L'absorption des sérums se fait sur culot de germes, chauffés à 100° pendant deux heures, puis lavés par de la solution physiologique. On utilise la récolte d'une boîte de Roux pour absorber 1  $\text{cm}^3$  de sérum au 1/10 ; on laisse en contact sérum et germes deux heures à 37°, puis la nuit à la température du laboratoire.

OXYDATION DES POLYSIDES PAR L'ACIDE PERIODIQUE. — L'acide periodique ne détruit que les sucres qui ont des groupements OH adjacents [4]. Cette oxydation a toujours été effectuée à 0° à l'obscurité au moyen d'un excès d'oxydant [38]. L'oxydation est arrêtée lorsque la courbe de la consommation d'acide periodique a atteint un plateau. Après dialyse à l'obscurité et lyophilisation, les polysides oxydés se conservent bien à l'état sec ; ils sont toutefois souvent difficiles à dissoudre. Il faut chauffer quelques instants leur suspension au bain-marie bouillant pour obtenir une solution limpide.

OBTENTION DES 3-6-DIDÉSOXYHEXOSES. — Les lipopolysides extraits des germes par le mélange phénol/eau à chaud [40] et ultracentrifugés sont hydrolysés pendant six minutes à 100° par  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , N. Après neutralisation par la baryte et concentration du liquide, les 3-6-didésoxyhexoses sont séparés de l'hydrolysât par chromatographie sur colonne de cellulose au moyen d'un mélange eau-acétone (5 : 95).

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### A. — EXPÉRIENCES D'INHIBITION.

a) *Antigènes 9 et 12 du polyside extrait de S. typhi (groupe D) : rôles du tyvelose (3-6 didésoxy-D-mannose) [7] du rhamnose et du glucose.*

Pour cette étude, nous avons utilisé un sérum de lapin et deux sérums de cheval anti-*S. typhi* dont l'un, le sérum n° 1, est celui qui nous a fourni les résultats de la précédente étude [36].

Nous avons précipité chacun de ces sérums par chacun des polysides suivants : le polyside extrait de *S. typhi* (PsTy des tableaux II et III), qui contient des groupement déterminants des antigènes 9 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et du tyvélose ; le même polyside oxydé par l'acide periodique

(PsTy<sub>ox</sub> des tableaux II et III), qui ne contient plus que des groupements déterminants de l'antigène 9 (2) et dont les sucres consti-

TABLEAU II. — Précipitation des sérums anti-*S. typhi*. % d'inhibition obtenus avec divers sucres.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> n° 1			Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> n° 2			Sérum de lapin anti <i>S. typhi</i>		
	précipité par			précipité par			précipité par		
	Ps Ty (12, 9)	Ps Ty <sub>ox</sub> (9)	Ps Pt B (12)	Ps Ty (12, 9)	Ps Ty <sub>ox</sub> (9)	Ps Pt B (12)	Ps Ty (12, 9)	Ps Ty <sub>ox</sub> (9)	Ps Pt B (12)
Glucose	3	2	3	7	6	21	58	très petit précipité	73
Galactose	5	0	3	0	4	14	25		26
Mannose	4	10	0	6	11	13	19		25
Rhamnose	23	2	85	6	6	20	11		10
Tyvélose	27	66	0	14	38	0	7		0

PsTy = Polyoside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose et tyvélose). PsTy<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. typhi* oxydé par l'acide périodique (galactose, mannose et tyvélose). PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B (glucose, galactose, mannose, rhamnose et abéquose). (9, 12); (9); (12) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur le polyoside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (9) correspond à l'antigène propre au groupe D auquel appartient *S. typhi*.

(2) En réalité, les groupements correspondant à la fraction 12<sub>3</sub> de l'antigène 12, présents dans *S. typhi* et absents de *S. paratyphi* B, ne sont pas détruits [36], mais les anticorps correspondants sont si peu nombreux dans nos sérums qu'on peut ne pas en tenir compte.



TABLEAU III. — Comparaison entre les activités inhibitrices des différents didésoxyhexoses sur la précipitation des sérums anti-*S. typhi* par le polyoside extrait de *S. typhi*.

Sucre innhibiteur	% inhibition de la précipitation obtenue avec le sérum de cheval anti <i>S. typhi</i>			
	n° 1		n° 2	
	et		et	
	Ps Ty (12,2)	Ps Ty <sub>ox</sub> (2)	Ps Ty (12,2)	Ps Ty <sub>ox</sub> (2)
Tyvélose	27	57	14	38
Abéquose	3.5	—	—	0
Colitose	3	—	—	3
Ascarylose	0	—	—	—
Paratose	0	—	—	1
3,6 didésoxy-D-mannose (Tyvélose synthétique)	—	68	—	—

Cf. les notes explicatives en bas du tableau II.

tutifs sont le galactose, le mannose et le tyvélose [36] ; le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPt B du tableau II) sur lequel seuls les groupements déterminants de l'antigène 12 (Cf. tableau I) sont capables de réagir avec les sérums anti-*S. typhi* qui contiennent les anticorps anti-9 et anti-12 ; ce polyoside contient du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et de l'abéquose.

Les résultats obtenus avec le sérum de cheval anti-*S. typhi* n° 1, rappelés dans le tableau II, avaient permis de conclure à la position terminale du tyvélose sur l'antigène 9 et du rhamnose sur l'antigène 12 [36].

On voit sur le même tableau II que le sérum de lapin nous a fourni des résultats tout à fait différents de ceux obtenus précédemment avec le sérum de cheval n° 1 : alors qu'avec celui-ci le tyvélose et le rhamnose inhibaient seuls la précipitation du polyoside typhique (PsTy du tableau II), cette fois-ci, ce sont ces deux sucres qui inhibent le moins cette précipitation ; le glucose est de beaucoup le plus actif. Il ne nous a pas été possible de travailler avec le polyoside oxydé qui précipite trop faiblement ce sérum pour qu'on puisse étudier l'inhibition quantitative de cette précipitation. Par contre, le polyoside paratyphique B (PsPtB du tableau II) donne un précipité faible mais dosable : sur cette précipitation le glucose est encore plus actif

que sur la précipitation du polyoside homologue. Il faut donc conclure que l'antigène 12, commun aux *Salmonella typhi* et paratyphi B, doit contenir une chaîne terminée par du glucose en plus de celle terminée par le rhamnose.

Les résultats obtenus avec le sérum de cheval n° 2 sont intermédiaires entre les précédents. Le tyvélose inhibe la précipitation par le polyoside typhique oxydé (PsTy<sub>ox</sub> du tableau II). Le rhamnose et le glucose inhibent un peu plus fortement que les autres sucres la précipitation par le polyoside hétérologue (PsPtB du tableau II).

La spécificité de l'inhibition obtenue avec le tyvélose naturel ou synthétique ressort de l'examen du tableau III sur lequel on voit que tous les autres 3-6 didésoxyhexoses sont inactifs.

b) *Antigènes 4 et 12 du polyoside de S. paratyphi B (groupe B)* : rôles de l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) [7] et du rhamnose.

Nous avons travaillé avec deux sérums de cheval et un sérum de lapin anti-*S. paratyphi B* que nous avons précipités par les polyosides suivants : le polyoside de *S. paratyphi B* (PsPtB des tableaux IV, V et VI) qui contient des groupements déterminants des antigènes 4, 5 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et de l'abéquose ; le même polyoside oxydé par l'acide periodique (PsPtB<sub>ox</sub> des tableaux IV et VI) qui ne contient plus que des groupements déterminants de l'antigène 4 [36] (et peut-être de l'antigène 5) et qui est constitué par du galactose, du mannose et de l'abéquose [38] ; le polyoside de *S. typhi* (Psty du tableau IV) sur lequel seuls les groupements déterminants de l'antigène 12 sont capables de réagir avec les sérums anti-*S. paratyphi B* qui contiennent les anticorps anti-4, anti-5 et anti-12.

ANTIGÈNE 4. — On voit (tableau IV) que l'abéquose inhibe la précipitation des deux sérums de cheval par le polyoside paratyphique B (PsPtB du tableau IV), et surtout par ce polyoside oxydé (PsPtB<sub>ox</sub> du tableau IV). Il doit donc se trouver en position terminale sur l'antigène 4, ou l'antigène 5. Le fait qu'on trouve de l'abéquose dans toutes les *Salmonella* du groupe B étudiées jusqu'ici [21] (contenant toutes l'antigène 4 mais pas toutes l'antigène 5) suggérerait fortement que l'abéquose ne jouait aucun rôle dans l'antigène 5. Toutefois, pour nous en assurer, nous avons d'abord étudié l'activité de l'abéquose sur la précipitation du sérum n° 1 par le polyoside extrait d'une souche de *S. typhi murium* (PsTm du tableau V) ne contenant pas d'antigène 5 : on constate une inhibition très nette (tableau V). Nous avons ensuite éliminé de ce même sérum les anticorps précipitables par le polyoside extrait de *S. typhi murium* et étudié l'activité de l'abéquose sur la précipitation des anticorps restants par le polyoside

TABLEAU IV. — Précipitation des sérums anti-*S. paratyphi* B. % d'inhibition obtenus avec divers sucres.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B n° 1			Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B n° 2			Sérum de lapin anti <i>S. paratyphi</i> B		
	précipité par			précipité par			précipité par		
	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4)	Ps Ty (12)	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4)	Ps Ty (12)	Ps PtB (4, 5, 12)	Ps PtB ox (4)	Ps Ty (12)
Glucose	4	4	16	4	0	5	9	5	
Galactose	4	8	24	4	1	0	7	5	
Mannose	4	6	25	0	1	7	4	1	
Rhamnose	2	5	27	4	1	28	7	3	
Abéquose	36	52	—	11	21	2	5	6	Tres petit précipité

PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B (glucose, galactose, mannose, rhamnose, abéquose). PsPtB<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B oxydé par l'acide periodique (galactose, mannose, abéquose). PsTy = Polyoside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose, tyvélose). (4, 5, 12) ; (4) ; (12) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur le polyoside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (4) correspond à l'antigène propre au groupe B auquel appartient *S. paratyphi* B.

TABLEAU V. — % d'inhibition des précipitations des anticorps 4 et 5 du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* B n° 1 par les différents sucres.

Précipitation par	Sucres inhibiteurs				
	Abéquose	Rhamnose	Mannose	Galactose	Glucose
Ps Tm (4, 12)	27	7	0	8	2
Ps PtB (4, 5, 12)	36	2	4	4	4
Ps PtB (4, 5, 12) après élimination des anticorps 4 et 12	4	—	—	—	—

PsTm = Polyoside extrait de *S. typhi murium* contenant les antigènes O 4 et 12 du tableau de Kauffmann-White. PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B contenant les antigènes O 4, 5 et 12 du tableau de Kauffmann-White.

TABLEAU VI. — Comparaison entre les activités inhibitrices des différents didésoxyhexoses sur la précipitation des sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B.

Sucre inhibiteur	% inhibition de la précipitation obtenue avec le sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> B			
	n° 3		n° 4	
	et		et	
	Ps PtB (4, 12)	Ps PtB <sub>ox</sub> (4)	Ps PtB (4, 12)	Ps PtB <sub>ox</sub> (4)
Abéquose (groupe B)	36	52	11	30
Abéquose (groupe C <sub>2</sub> )	—	44	—	36
Tyvélose	10	—	—	14
Ascarylose	0	—	—	—
Colitose	3, 4	13	—	9
Paratose	0	—	—	5
3, 6 didésoxy-D-galactose (abéquose synthétique)	—	48	—	32

Cf. les notes explicatives au bas du tableau IV.

paratyphique B : il n'y a pas d'inhibition (tableau V). C'est donc bien sur l'antigène 4 que se trouve en position terminale l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose). La spécificité de l'abéquose

naturel ou synthétique vis-à-vis des autres 3-6 didésoxyhexoses, dans cette inhibition, ressort de l'examen du tableau VI.

ANTIGÈNE 12. — La position terminale du rhamnose sur l'antigène 12 des polyosides typhique et paratyphique B se retrouve ici, puisque c'est le seul sucre capable d'inhiber la précipitation du sérum de cheval n° 2 par le polyoside typhique (PsTy du tableau IV). Les résultats obtenus pour cette même précipitation avec le sérum de cheval n° 1 sont beaucoup moins nets : les trois hexoses inhibant, eux aussi, la précipitation. On ne retrouve, toutefois, l'inhibition spécifique par le glucose des anticorps 12 du sérum de lapin anti-*S. typhi* (tableau II), ni avec ces sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B, ni avec le sérum de lapin avec lequel nous n'avons obtenu aucune inhibition nette par les cinq sucres simples constitutifs du polyoside extrait de *S. paratyphi* B (tableau IV).

c) Antigènes 1, 2 et 12 du polyoside de *S. paratyphi* A (groupe A) : rôles du glucose, du paratose (3-6 didésoxy-D-glucose) [8] et du rhamnose.

Nous avons travaillé avec un sérum de cheval et un sérum de lapin anti-*S. paratyphi* A et les deux sérums de cheval n° 1 anti-*S. paratyphi* B et anti-*S. typhi*. Comme polyosides nous avons utilisé :

1° Le polyoside de *S. paratyphi* A (PsPtA du tableau VII) qui contient des groupements déterminants des antigènes 1, 2 et 12 et qui est constitué par du glucose, du galactose, du mannose, du rhamnose et du paratose ;

2° Le même polyoside oxydé par l'acide periodique (PsPtA<sub>ox</sub> du tableau VII) qui contient du galactose, du mannose, du rhamnose, du paratose et des traces de glucose [38], mais dont la majeure partie des antigènes 1 et 12 ont été détruits et qui ne précipite plus du sérum de cheval que 60 p. 100 des anticorps précipitables par le polyoside non oxydé ;

3° Le polyoside de *S. paratyphi* A var. *durazzo* qui ne contient pas d'antigène 1 mais seulement des groupements déterminants des antigènes 2 et 12 ;

4° Le polyoside de *S. niloese* [antigènes 1, 3, 19] (PsNi du tableau VII) sur lequel seul l'antigène 1 est capable de réagir avec les sérums anti-*S. paratyphi* A qui contiennent les anticorps anti-1, anti-2 et anti-12.

ANTIGÈNE 2. — Quels que soient le sérum et le polyoside utilisés (extrait de *S. paratyphi* A ordinaire ou variante *durazzo*), il nous a été impossible d'obtenir une inhibition très significative avec le paratose. L'inhibition observée avec le polyoside de *S. paratyphi* A [7 p. 100] (PsPtA du tableau VII) est toutefois légèrement augmentée lorsqu'on utilise ce polyoside oxydé [11 p. 100] (PsPtA<sub>ox</sub> du tableau VII) ; mais nous n'avons pu



TABLEAU VII. — % d'inhibition des précipitations obtenues avec le polyside extrait de *S. paratyphi* A, et divers sérums homologues et croisés, ainsi qu'avec un sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A et divers polysides précipitant ce sérum.

Sucre inhibiteur	Sérum de cheval anti <i>S. paratyphi</i> A précipité par				Sérum de lapin anti <i>S.</i> <i>paratyphi</i> A précipité par Ps PtA (1,2,12)	Sérum de cheval anti <i>S. typhi</i> précipité par Ps PtA (12)	Sérum de cheval anti <i>S.</i> <i>paratyphi</i> B précipité par Ps Pt A (12)
	Ps PtA (1,2,12)	Ps PtA <sub>ox</sub> (2)	Ps Ni (1)	Ps Ty (12)			
Glucose	16	11	37	8	-	4	8
Galactose	6	7	17	7	-	4	12
Mannose	5	6	20	7	-	1	16
Rhamnose	2	4	9	10	-	61	52
Paratose	7	11	-	-	10	-	-

PsPtA = Polyside extrait de *S. paratyphi* A (glucose, galactose, mannose, rhamnose, paratose). PsPtA<sub>ox</sub> = Polyside extrait de *S. paratyphi* A oxydé par l'acide périodique (galactose, mannose, paratose, rhamnose, traces de glucose. PsNi = Polyside extrait de *S. nitrore* (glucose, galactose, mannose, rhamnose) donnant une réaction croisée avec les sérums anti-*S. paratyphi* A. PsTy = Polyside extrait de *S. typhi* (glucose, galactose, mannose, rhamnose, tyvélose) donnant une réaction croisée avec le sérum anti-*S. paratyphi* A. (1, 2, 12) ; (2) ; (12) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur le polyside et responsables de la précipitation dont l'inhibition est étudiée dans cette colonne. Le chiffre souligné (2) correspond à l'antigène spécifique du groupe A auquel appartient *S. paratyphi* A.

dépasser 15 p. 100 d'inhibition même en utilisant jusqu'à sept fois plus de paratose. Ces chiffres ne suffiraient pas, par eux-mêmes, à affirmer la position terminale du paratose sur l'antigène 2 si sa rapide libération au cours de l'hydrolyse, sa présence dans les polyosides extraits de *S. paratyphi* A var. *durazzo* et *S. kiel* [21], qui possèdent l'antigène 2 et son absence des *Salmonella* ne contenant pas l'antigène 2 ne le suggéraient fortement.

ANTIGÈNE 12. — La position terminale du rhamnose sur l'antigène 12 du polyoside extrait de *S. paratyphi* A (PsPtA du tableau VII) ressort de l'inhibition par ce sucre de la précipitation des sérums anti-*S. typhi* et anti-*S. paratyphi* B par ce polyoside (tableau VII), puisque dans ces sérums, seuls les anticorps anti-12 sont précipitables par le polyoside de *S. paratyphi* A. On n'observe pas cette inhibition avec le sérum anti-*S. paratyphi* A.

ANTIGÈNE 1. — La position terminale du glucose sur l'antigène 1 ressort de l'inhibition par ce sucre des précipitations du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A par le polyoside extrait de *S. paratyphi* A et le polyoside extrait de *S. niloese* (tableau VII).

d) *Antigène 35 du polyoside de S. adelaide (groupe P)* : rôle du colitose (3-6 didésoxy-L-galactose), isomère optique de l'abéquose [25].

La grande similitude qui existe entre l'antigène 35 des *Salmonella* du groupe P et l'antigène O de certains *E. coli* (O 111 : B4) est bien connue de tous les immunologistes qui travaillent sur les *Enterobacteriaceae*. C'est ce qui nous a permis de travailler avec deux sérums anti-*E. coli* O 111 : B4 (un sérum de cheval et un sérum de lapin), aussi bien qu'avec un sérum de lapin anti-*S. adelaide*. Nous avons constaté nous-mêmes la très grande parenté immunologique de nos sérums, puisque :

1° La saturation des sérums anti-*E. coli* par *S. adelaide* supprime toutes ou presque toutes les agglutinines pour le germe homologue, et la saturation du sérum anti-*S. adelaide* par *E. coli* abaisse considérablement le titre en agglutinines pour la *Salmonella* (tableau VIII, sur lequel il faut lire  $< 100$  au lieu de 100).

2° La précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* par les polyosides extraits de *E. coli* et *S. adelaide* est identique. Celle du sérum de lapin anti-*E. coli* est même légèrement moindre avec le polyoside homologue (tableau VIII).

Le tableau IX montre bien le pouvoir inhibiteur spécifique du colitose sur la précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* par le polyoside de *S. adelaide*. Les autres 3-6 didésoxyhexoses et les deux autres sucres constitutifs du polyoside de *S. adelaide* (glucose et galactose) sont inactifs ou beaucoup moins actifs (tyvé-

TABLEAU VIII. — Réactions croisées entre *E. coli* O 111 : B4 et *S. adelaide* dont les antigènes O 111 et 35 sont identiques.

	Sérum de cheval anti <i>E. coli</i> (111 = 35)		Sérum de lapin anti <i>S. adelaide</i> (111 = 35)			
	<i>E. coli</i> (homol.)	<i>S. adelaide</i> (hétérol.)	<i>E. coli</i> (homol.)	<i>S. adelaide</i> (hétérol.)	<i>E. coli</i> (hétérol.)	<i>S. adelaide</i> (homol.)
A g g l u t i n a t i o n par						(35 = 111)
Titre d'agglutinines (x)						
- avant absorption						
par les germes hétérologues	25.000	12.800+	3.200	1.600	3.200	3.200
- après absorption						
par les germes hétérologues	100	100	200	100	100	400
P r é c i p i t a t i o n par						
	Ps Co (homol.)	Ps Ad (hétérol.)	Ps Co (homol.)	Ps Ad (hétérol.)	Ps Co (hétérol.)	Ps Ad (homol.)
Précipitines $\mu\text{g N/cm}^3$	408	412	82	109	300	504
% Inhibition de la précipitation						
par						
colitose extrait de <i>E. coli</i>	46	20	39	21	47	22
colitose extrait de <i>S. adelaide</i>	49	28	48	28	50	19

PsCo = Polyoside extrait de *E. coli* O 111 : B4 (glucose, galactose, colitose). PsAd = Polyoside extrait de *S. adelaide* (glucose, galactose, colitose). (x) = Réciproque de la dernière dilution donnant une agglutination visible à l'œil nu. Lire  $\times 100$  au lieu de 100.

TABLEAU IX. — Pouvoir inhibiteur de différents sucres sur la précipitation du sérum de cheval anti-*E. coli* O 111 : B4 par le polyoside de *S. adelaide*.

	Sucres inhibiteurs						
	Glucose	Galactose	Colitose (Co)	Colitose (Ad)	Tyvélose	Abéquose	Paratose
% inhibition du précipité obtenu avec le sérum de cheval anti <i>E. coli</i> et le polyoside de <i>S. adelaide</i>	0	5	20	28	13	0	3

Colitose (Co) = Colitose extrait de *E. coli* O 111 : B4. Colitose (Ad) = Colitose extrait de *S. adelaide*.

lose). Par contre, le colitose extrait de *E. coli* (colitose Co) est aussi actif que celui extrait de *S. adelaide* (colitose Ad). Ceci est vrai quel que soit le système précipitant considéré (tableau VIII), ce qui prouve bien l'identité de ces deux sucres, confirmée d'ailleurs par la chimie (tableau X).

TABLEAU X. — Identité de quelques constantes chimiques des colitoses extraits de *E. coli* et *S. adelaide*.

	Sucres	Alcools (x)	
	$[\alpha]_D$	Fp	$[\alpha]_D$
Colitose extrait de - <i>E. coli</i>	+4°	92-94°	-51° <sub>+2</sub>
- <i>S. adelaide</i>	+5,5°	91-93°	-51° <sub>+2</sub>

(x) = Alcool obtenu par réduction de l'abéquose au moyen du borohydrure de sodium [9].  $[\alpha]_D$  = Pouvoir rotatoire dans l'eau à 20°. Fp = Point de fusion.

e) Antigène 8 du polyoside de *S. newport* (groupe  $C_2$ ) : rôle de l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose).

Davies [5] et Mikulaszek [28], analysant les polyosides extraits de trois *Salmonella* du groupe  $C_2$ , qui possèdent les antigènes 6 et 8 (*S. newport*, *S. kottbus* et *S. virginia*), ont montré que ces trois polyosides contenaient tous un sucre migrant en chromatographie comme l'abéquose. Par contre, dans aucune des *Salmonella* du groupe  $C_1$  (antigènes 6 et 7) analysées jusqu'ici [21], on n'a retrouvé ce sucre. Puisque l'antigène 8 du groupe  $C_2$  est le

	Sérum de cheval		Sérum de lapin	
	anti $\frac{S. paratyphi B}{(4, 5, 12)} (x)$	anti $\frac{S. newport}{(6, 8)}$	anti $\frac{S. paratyphi B}{(4, 5, 12)}$	anti $\frac{S. newport}{(6, 8)}$
Agglutination par	$S. paratyphi B$ (homol.)	$S. newport$ (hétérol.)	$S. paratyphi B$ (homol.)	$S. newport$ (hétérol.)
	$S. paratyphi B$ (homol.)	$S. newport$ (hétérol.)	$S. paratyphi B$ (hétérol.)	$S. newport$ (homol.)
Titres d'agglutinines (xx) avant absorption par les germes hétérol. après absorption par les germes hétérol.	6.400	3.200	6.400	6.400+
	3.200	100	6.400	3.200
Précipitation par	$PstB$ (homol.)	$PstB$ (hétérol.)	$PstB$ (homol.)	$PstB$ (hétérol.)
	$PstB$ (homol.)	$PstB$ (hétérol.)	$PstB$ (homol.)	$PstB$ (hétérol.)
Précipitines $\mu g/cm^3$ des anticorps totaux précipités par le polyside	308	37	240	0
	(100)	(12)	(100)	306
% Inhibition de la précipi- tation par abéquose extrait de				
	$\frac{S. para B}{S. newport}$	$\frac{65}{65}$	$\frac{69}{63}$	$\frac{5}{-}$
		3	3	0
				0

$PstB$  = Polyside extrait de *S. paratyphi B* (galactose, glucose, mannose, rhamnose, abéquose).  $PstNp$  = Polyside extrait de *S. newport* (galactose, glucose, mannose, rhamnose, abéquose). (x) = Antigènes O du tableau de Kauffmann-White présents sur la *Salmonella* ayant servi à préparer le sérum. (xx) = Récioproque de la dilution la plus forte à laquelle on observe à l'œil nu l'agglutination des germes. Sur la deuxième ligne lire < 100 au lieu de 100.



seul qui ne soit pas commun aux deux groupes, il faut bien penser que cet abéquose est présent dans l'antigène 8. Nous nous sommes demandé s'il s'agissait vraiment de l'abéquose ou d'un nouveau 3-6 didésoxyhexose migrant comme l'abéquose en chromatographie, comme c'est le cas pour le colitose. Nous avons travaillé avec un sérum de cheval et un sérum de lapin anti-*S. newport* et les sérums de cheval n° 2 et de lapin anti-*S. paratyphi* B du tableau IV.

On voit sur le tableau XI (sur lequel il faut lire à la deuxième ligne, « après absorption »  $< 100$  au lieu de 100) que, contrairement aux antigènes 35 de *S. adelaide* et O 111 de *E. coli* précédemment étudiés, les antigènes 4 et 8 ne donnent entre eux que de très faibles réactions croisées : les sérums de cheval donnent une très faible précipitation croisée, et si leur titre en agglutinines vis-à-vis de la *Salmonella* hétérologue est élevé, l'absorption du sérum par cette *Salmonella* ne fait pratiquement pas baisser le titre en agglutinines vis-à-vis de la souche homologue. Les sérums de lapin ne précipitent pas le polyside hétérologue et n'agglutinent que très faiblement la souche correspondante. Cette agglutination croisée est d'ailleurs absente des sérums des lapins moins fortement immunisés que les nôtres, généralement utilisés par les sérologistes, d'où la notion courante d'indépendance totale des deux groupes B (antigènes 1, 4, 5, 12) et C<sub>2</sub> (antigènes 6, 8).

Il nous a été impossible d'inhiber la précipitation des deux sérums anti-*S. newport* par le polyside de *S. newport* (intact ou oxydé par l'acide periodique) au moyen de l'abéquose, que celui-ci soit extrait de *S. paratyphi* B ou de *S. newport* (tableau XI) ; par contre, la précipitation croisée des sérums de cheval a été inhibée aussi bien par les deux sucres (tableau XI), montrant,

TABLEAU XII. — Identité de quelques constantes chimiques des abéquoses extraits d'une *Salmonella* du groupe B (*S. abortus equi*) et d'une *Salmonella* du groupe C<sub>2</sub> (*S. newport*).

	Sucre	Alcool	
	$[\alpha]_D$	Fp	$[\alpha]_D$
Abéquose extrait de			
- <u><i>S. abortus equi</i></u> (groupe B)	-3,6°	93-94°	+54° <sub>+3</sub>
- <u><i>S. newport</i></u> (groupe C <sub>2</sub> )	-5°	90°	+50° <sub>+3</sub>

Cf. les notes explicatives au bas du tableau IX.

d'une part, que le didésoxyhexose extrait de *S. newport* était bien de l'abéquose et, d'autre part, que *cet abéquose se trouvait en position terminale sur le polyoside extrait de S. newport* comme sur le polyoside extrait de *S. paratyphi* B, ainsi que le laissait déjà prévoir sa rapide libération au cours de l'hydrolyse acide du polyoside extrait de *S. newport* : il est responsable des réactions croisées qu'on peut observer entre ces deux polyosides et les *Salmonella* qui les portent.

Les résultats de l'étude chimique des abéquoses extraits de *S. newport* et de *S. paratyphi* B confirment leur identité (tableau XII).

#### B. — PRÉCIPITATIONS CROISÉES.

Les résultats des inhibitions spécifiques nous ont montré que, généralement, deux antigènes distincts portent à leur extrémité des sucres différents, mais que ce n'est pas toujours le cas, puisque l'abéquose est présent à l'extrémité des antigènes 4 et 8 et le glucose à l'extrémité des antigènes 1 et 12. On peut donc penser que dans ces deux cas le sucre terminal est lié, dans les antigènes distincts, à des sucres différents. En vue de déterminer la nature de ces sucres sur l'antigène 4, nous avons entrepris cette étude des précipitations croisées.

Les précipitations croisées du sérum anti-*S. typhi* par le dextrane et le mannane de la levure, découvertes par Heidelberger et Cordoba [12] et confirmées depuis [36], avaient permis de donner un schéma des sucres présents à la suite du tyvélose et du rhamnose sur les chaînes latérales responsables de la spécificité des antigènes 9 et 12 [36]. Nous avons étudié de la même façon le sérum anti-*S. paratyphi* B n° 1 de cheval qui est précipité par le dextrane et les galactomannanes (de gum gatto, de luzerne ou de trèfle) [12]. Ces précipitations sont bien spécifiques, puisqu'elles sont supprimées lorsqu'on élimine du sérum tous les anticorps précipitables par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPtB du tableau XIII). Puisque l'élimination des anticorps 4, soit par le polyoside extrait de *S. typhi murium* (PsTm du tableau XIII), soit par le polyoside oxydé de *S. paratyphi* B (PsPtB<sub>ox</sub> du tableau XIII) supprime plus ou moins complètement les anticorps précipitables par les galactomannanes de gum gatto et de luzerne, il faut en conclure que ceux-ci font partie des anticorps anti-4. Leur absence parmi les anticorps anti-12 est prouvée par le fait que l'élimination de ces anticorps 12 par le polyoside extrait de *S. typhi* (PsTy du tableau XIII) ne fait pratiquement pas baisser la quantité d'anticorps précipitables par le galactomannane de luzerne.

Les anticorps précipitables par le dextrane font, au contraire, au moins partiellement, partie des anticorps 12, puisque l'élimination de ceux-ci par le polyoside extrait de *S. typhi* (PsTy du tableau XIII) diminue la quantité d'anticorps précipitables par le dextrane. Ce fait est encore plus net avec le sérum anti-*S. typhi* où tous les anticorps

TABLEAU XIII. — Réactions croisées entre les sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B et anti-*S. typhi* et quelques polysides.

Polyoside précipitant	Sérum absorbé par				
	-	Ps PtB	Ps PtB <sub>ox</sub>	Ps Ty	Ps Tm
	I - Sérum anti <i>S. paratyphi</i> B				
	a) anticorps restants				
	<u>4</u> , <u>5</u> , <u>12</u> <sup>(a)</sup>	-	12	<u>4</u> , <u>5</u>	5
Galactomannanes de	b) µg. d'azote du précipité				
Gum Gatto	270	19	40	-	-
Luzerne	255	28	-	243	2
Trèfle	200	25	-	-	-
Dextrane	67	-	-	33	
	II - Sérum anti <i>S. typhi</i>				
	a) anticorps restants				
	<u>2</u> , <u>12</u>	<u>2</u>			
	b) µg. d'azote du précipité				
Dextrane	108	7			

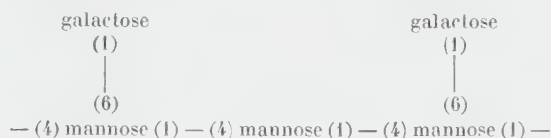
(a) Anticorps correspondant aux antigènes O du tableau de Kauffmann-White. Les chiffres soulignés désignent les antigènes spécifiques du groupe auquel appartient la *Salmonella* contre laquelle fut préparé le sérum. PsPtB = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B. PsPtB<sub>ox</sub> = Polyoside extrait de *S. paratyphi* B oxydé par l'acide periodique. PsTy = Polyoside extrait de *S. typhi*. PsTm = Polyoside extrait de *S. typhi* murium.

précipitables par le dextrane sont éliminés après précipitation du sérum par le polyoside extrait de *S. paratyphi* B (PsPtB du tableau XIII) qui précipite les anticorps 12.

Nous retrouvons donc le résultat de notre précédente étude : présence dans l'antigène 12 de glucoses liés comme dans le dextrane. Toutefois, la découverte, dans l'antigène 12, d'une nouvelle chaîne latérale terminée par du glucose ne nous permet plus de conclure à la présence de ces glucoses sur la chaîne latérale terminée par du rhamnose ; il se peut que les anticorps précipi-

tables par le dextrane correspondent à cette chaîne terminée par du glucose, même si le glucose est incapable d'inhiber la précipitation de ces anticorps par le polyside qui contient cette chaîne latérale.

D'autre part, l'antigène 4 doit contenir des groupements déterminants présents dans les galactomannanes. Ceux-ci sont constitués par une longue chaîne de mannoses liés en 1-4 sur lesquels sont greffés des galactoses accrochés au carbone 6 de certains mannoses suivant le schéma ci-dessous [*in 43*] :



Il faut penser que les anticorps anti-4 précipitables par les galactomannanes sont spécifiques soit d'un galactose terminal, soit du groupe galactose-mannose, soit de la chaîne de mannoses liés en 1-4. Cette dernière possibilité est éliminée par le fait que le polyside paratyphique B oxydé par l'acide periodique est encore capable de précipiter ces anticorps. Les mannoses liés en 1-4 sont détruits par cette oxydation et ne pourraient donc plus réagir avec les anticorps correspondants. Le rôle du seul galactose terminal ne semble pas compatible avec les résultats de Heidelberger et Cordoba [*12*] qui n'ont pas obtenu de précipitations croisées avec d'autres polysides contenant des galactoses terminaux. De plus, il est incompatible aussi avec le fait que le polyside oxydé par l'acide periodique élimine les anticorps correspondants, puisque l'oxydation periodique devrait détruire tout galactose terminal. On est donc amené à admettre que le groupement déterminant commun à l'antigène 4 et aux galactomannanes est constitué par le groupe galactose-mannose et, pour les mêmes raisons que plus haut, que ce groupe doit être précédé d'un autre sucre non oxydable par l'acide periodique ; seul parmi les sucres constitutifs du polyside B, l'abéquose répond à ce critère puisqu'étant le 3-6 didésoxy-D-galactose, lorsqu'il est lié en 1, il ne contient plus 2 OH adjacents (*Cf. techniques*, p. 306).

Nous proposons donc pour l'antigène 4 le schéma :



#### DISCUSSION.

Bien que l'on ait longtemps considéré les « antigènes » O, attribués aux *Salmonella* dans le tableau de Kauffmann-White, comme des molécules distinctes, les connaissances acquises actuellement

en immunochimie permettent de penser qu'il s'agit en réalité de chaînes latérales oligosidiques portées par une même molécule. Ceci a d'ailleurs été démontré pour les antigènes 6 et 8 de *S. newport* [33 a]; 1, 3, 19 de *S. senftenberg* [33 a]; 1, 4, 12 de *S. paratyphi* B [33 b] et 9 et 12 du polyside extrait de *S. typhi* [33 c]. En tenant compte de ce fait, nous avons résumé les résultats expérimentaux acquis dans cette étude et dans la pré-

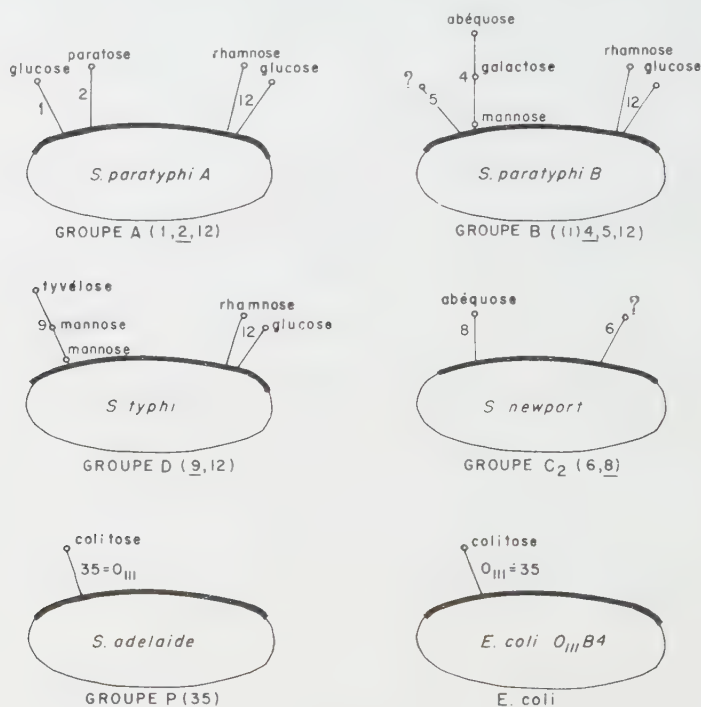


FIG. 1. — Schéma indiquant les sucres connus comme responsables de la spécificité de quelques antigènes O de Kauffmann-White.

Les chiffres représentent les antigènes O de Kauffmann-White. Les chaînes latérales des polysides responsables de la spécificité de ces antigènes, ont été figurées par des « épines » qui sortent de la membrane des microbes, figurée par une ellipse encadrant le nom du germe. Sur ces épines ont été inscrits les sucres dont nous avons déterminé le rôle dans la spécificité de l'antigène O qui le porte, ainsi que sa place (terminale ou non) sur la chaîne polysidique à laquelle il appartient.

cédente [36], dans les schémas de la figure 1 où les antigènes O de chaque *Salmonella* sont représentés sous forme d'épine portant les sucres connus comme responsables de leur spécificité.



Ceci n'exclut aucunement l'existence éventuelle d'autres chaînes oligosidiques dans chacun de ces antigènes, ainsi que la présence d'éléments autres que les polyosides, comme l'un de nous l'a déjà signalé [33].

A chacune de ces chaînes oligosidiques correspondent dans certains immunsérums des anticorps susceptibles d'être inhibés par le seul sucre terminal [anticorps anti-tyvélose (anti-9) des sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B ; anticorps anti-rhamnose (anti-12) de ces mêmes sérums ; anticorps anti-glucose (anti-1) du sérum de cheval anti-*S. paratyphi* A ; anticorps anti-glucose (anti-12) du sérum de lapin anti-*S. typhi*]. Ces anticorps sont parfois si peu nombreux que nous n'avons pu les mettre en évidence que par l'artifice des réactions croisées (anticorps anti-abéquose (anti-8) du sérum anti-*S. newport*), souvent même, nous n'avons pas pu les déceler (anticorps anti-tyvélose (anti-9) du sérum anti-*S. typhi* de lapin ; anticorps anti-abéquose (anti-4) du sérum anti-*S. paratyphi* B de lapin ; anticorps anti-paratose (anti-2) des sérums anti-*S. paratyphi* A).

Nous allons discuter séparément les perspectives que ces résultats ouvrent dans les deux domaines de :

a) la bactériologie : classification des *Salmonella* ;

b) l'immunologie : importance des groupements apolaires dans la spécificité des sucres, réactions croisées et rôle de l'espèce dans la spécificité des anticorps.

#### A. — BACTÉRIOLOGIE.

##### *Classification des « Salmonella ».*

La classification des *Salmonella* dans le tableau de Kauffmann-White ne reposait, jusqu'à présent, que sur des bases purement sérologiques. L'étude de la constitution chimique d'une fraction de quelques-uns de ces antigènes apporte une nouvelle valeur à cette classification. Elle montre en particulier la signification réelle des groupes ainsi établis, puisqu'ils contiennent souvent un didésoxyhexose qui leur est propre. Une étude systématique des *Salmonella* [21] permettra peut-être de trouver les autres isomères des 3-6-didésoxyhexoses et d'autres sucres inconnus jusqu'ici. La présence du même abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) dans deux antigènes de groupes distincts (4 du groupe B et 8 du groupe C<sub>2</sub>) fait envisager une parenté de ces groupes plus étroite qu'elle n'apparaissait d'après le tableau de Kauffmann-White : elle explique en tout cas les faibles réactions croisées signalées déjà par quelques auteurs [42].

La présence dans l'antigène 12 de deux chaînes oligosidiques, terminées l'une par le rhamnose et l'autre par le glucose, est en bon accord avec la complexité que les sérologistes ont reconnue à cet antigène (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) sans que nous puissions actuellement

attribuer à l'un de ces sous-groupes l'une ou l'autre des deux chaînes oligosidiques. Soulignons d'ailleurs qu'il est fort possible que les antigènes O des *Salmonella* soient plus complexes que ne laisse prévoir le tableau de Kauffmann-White (comme on le sait déjà pour l'antigène 9 [39, 20]). Il se pourrait très bien que correspondent à un seul antigène plusieurs chaînes terminées par un même sucre, sans que les expériences d'inhibition nous permettent de les découvrir.

Quoi qu'il en soit, la connaissance de la constitution des chaînes oligosidiques constituant, même partiellement, les antigènes spécifiques des *Salmonella*, fait espérer pouvoir réaliser un jour la synthèse des oligosides spécifiques et résoudre ainsi le problème posé depuis si longtemps aux immunologistes : la préparation de sérums spécifiques ne contenant que des anticorps anti-9, anti-4, anti-12, etc. Ce problème n'est résolu actuellement que par la saturation des sérums au moyen de *Salmonella* convenables, procédé long et fastidieux. La préparation d'antisérums spécifiques des sucres, ou des di- ou triholosides terminaux devrait apporter une solution plus élégante et plus rapide à ce problème.

Enfin, la possibilité de déterminer la constitution chimique de l'antigène 1, dont nous savons déjà qu'il contient un glucose terminal, est particulièrement intéressante. On sait en effet que cet antigène n'est présent (au moins chez les *Salmonella* des groupes A, B et D) que sur les souches lysogènes pour le phage  $\phi$  [15]. Un travail en commun avec le Dr Stocker est en cours en vue d'aboutir à la connaissance de sa constitution chimique.

## B. — IMMUNOLOGIE.

a) *Rôle des groupements apolaires dans la spécificité des sucres terminaux.* — Lorsque l'on compare les résultats des expériences d'inhibition obtenus avec les 3-6 didésoxyhexoses, à ceux obtenus avec les hexoses, on est frappé, d'une part, par les petites quantités qu'il est nécessaire de mettre en jeu (nous utilisons 4 mg = 27  $\mu$ mol. de 3-6 didésoxyhexose contre 40 mg = 220  $\mu$ mol. d'hexose, voisins des 300  $\mu$ mol. utilisées par Kabat [48]) et, d'autre part, par la spécificité de ces 3-6 didésoxyhexoses : en dehors du tyvélose dans le tableau IX, on peut dire, en effet, que seul le sucre présent sur le polyside est actif, les autres isomères étant inactifs. C'est déjà ce que nous avons constaté avec le fucose et le rhamnose dans l'inhibition des anticorps 12 [36], et ceci s'oppose aux résultats obtenus par nous et par les autres auteurs avec les hexoses : le sucre présent sur le polyside est le plus actif, mais les autres isomères possèdent

aussi une activité non négligeable. Ceci serait en bon accord avec la conception de Pauling rappelée dernièrement par Marrack et Orlans [26] : « La spécificité de la combinaison doit dépendre de la distance entre un certain nombre d'atomes de l'antigène ou du haptène et la surface du site antigénique de l'anticorps. » Les groupes  $\text{CH}_2$ , hydrophobes, des désoxysucres doivent être beaucoup plus près de la surface correspondante de l'anticorps que les  $\text{CHOH}$ , hydrophiles, seuls présents sur les autres sucres : ils peuvent contribuer ainsi à la plus grande spécificité des groupements déterminants auxquels ils appartiennent.

b) *Réactions croisées.* — La multiplicité des anticorps correspondant à un même antigène ne fait plus de doute depuis les travaux de Landsteiner, Heidelberger et Haurowitz [22]. Les études physico-chimiques réalisées depuis sur les antigènes artificiels par Talmage et ses collaborateurs [37], Karush et Eisen [49], Pressman et ses collaborateurs [30] ont confirmé et complété les conclusions des premiers auteurs.

Cette multiplicité est due, en partie, à la présence de plusieurs groupements déterminants distincts sur l'antigène correspondant et, en partie, à la présence de plusieurs anticorps correspondant à un groupement unique. Elle explique le mécanisme des réactions croisées : tout antigène qui possède un groupement déterminant *totale*ment ou *partiellement* semblable à l'un de ceux de l'antigène homologue sera susceptible de s'unir avec la totalité, ou une partie, des anticorps auxquels le même groupement de l'antigène homologue a donné naissance.

Les réactions croisées entre des polyosides naturels d'origine animale, végétale ou microbienne ont pu être ainsi expliquées par la reconnaissance de groupements déterminants communs totalement ou partiellement identiques [Cf. 13, 14, 11, 27].

Dans la présente étude nous apportons de nouveaux exemples de réactions croisées.

Nous avons constaté l'existence de chaînes oligosidiques identiques dans les polyosides extraits de *S. adelaide* et *E. coli* O 111 : B4 (qui sont immunologiquement si proches que seul le sérum de lapin anti-*S. adelaide* peut les différencier) et dans les polyosides extraits de *S. typhi*, *S. paratyphi* A et *S. paratyphi* B, qui contiennent en commun une partie de l'antigène 12 ( $12_1$ ,  $12_2$ ,  $12_3$  dans *S. typhi* ;  $12_1$ ,  $12_2$  dans *S. paratyphi* B ;  $12_1$ ,  $12_3$  dans *S. paratyphi* A).

Pour expliquer les réactions croisées observées entre les galactomannanes et le polyoside de *S. paratyphi* B, l'hypothèse la plus compatible avec les résultats de l'oxydation périodique (Cf. p. 321) est de supposer que la chaîne oligosidique mannose-galactose, présente sur le galactomannane, constitue une partie de la chaîne

oligosidique qui porte la spécificité de l'antigène 4 sur le polyside extrait de la *Salmonella* : abéquose-galactose-mannose. La figure 2 exprime schématiquement le mode d'attachement des anticorps anti-4 avec les galactomannanes, ainsi que celui des anticorps anti-9 avec le mannane de la levure [36]. Nous ne con-

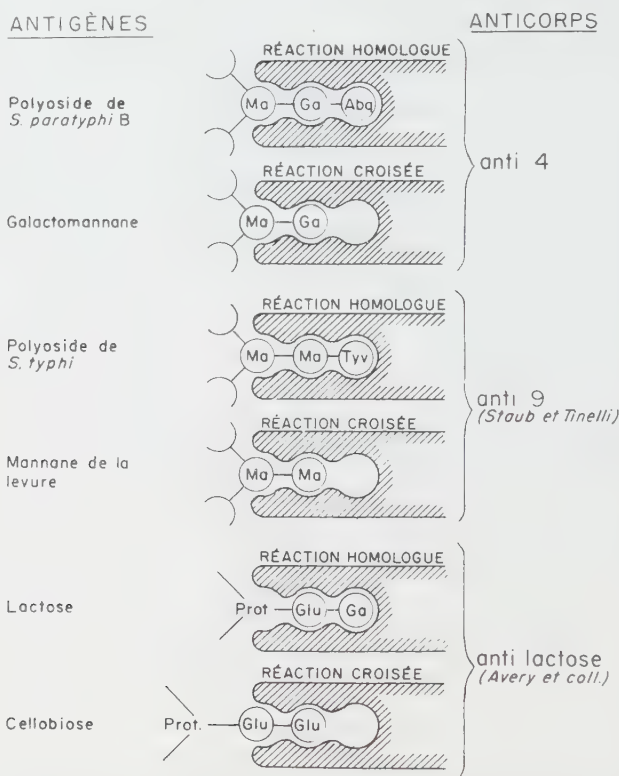


FIG. 2. — Réactions croisées entre des chaînes oligosidiques ne possédant que quelques sucres en commun.

naissions pas d'autres exemples de telles réactions croisées entre polysides naturels. Néanmoins, on pourrait peut-être expliquer de la même façon la précipitation des anticorps anti-lactose ( $\beta$ -D-galactopyrannose 1-4 D-glucopyrannose) par le cellobiose ( $\beta$ -D-glucopyrannose 1-4 D-glucopyrannose) [fig. 2] observée par Avery, Gœbel et Babers [1]. De plus, les récents travaux de Kabat [17] sur les anticorps anti-dextrane et de Karush [49] sur les anticorps anti-lactose ont montré que les anticorps anti-oligosides possédaient une affinité encore marquée pour le deuxième

sucres de la chaîne oligosidique auquel ils correspondent. Ces résultats montrent qu'il faut être prudent dans l'interprétation des réactions croisées au moyen d'un polyside de constitution connue. Un sucre terminal de ce polyside peut très bien s'unir à des anticorps correspondant à un oligoside sur lequel ce sucre n'est pas terminal.

Enfin nous avons établi que la très faible réaction croisée observée entre le polyside de *S. paratyphi* B et celui de *S. newport* était due à la présence d'un abéquose terminal sur ces deux polysides. Le fait qu'on ne puisse précipiter que 12 p. 100 des anticorps du sérum anti-*S. paratyphi* B par le polyside *newport* (tableau XI), alors que 50 p. 100 de ces mêmes anticorps sont susceptibles d'être inhibés par l'abéquose, signe l'hétérogénéité de ces derniers anticorps. Cette hétérogénéité peut être due à la présence de plusieurs chaînes latérales différentes, toutes terminées par de l'abéquose, sur le polyside de *S. paratyphi* B, dont l'une seulement de composition inconnue serait présente sur *S. newport* ; elle peut être due aussi à la présence de plusieurs sortes d'anticorps correspondant à la chaîne abéquose-galactose-mannose indiquée sur la figure 1. Les anticorps anti-abéquose étant seuls capables de s'unir à une chaîne abéquose-X-Y présente sur le polyside de *S. newport*, soit parce que le sucre X n'est pas du galactose, soit parce que l'abéquose n'est pas lié à ce sucre de la même façon que dans *S. typhi* (liaison  $\alpha$  ou  $\beta$ ), soit parce que l'abéquose terminal lui-même se trouve sous une forme différente dans les deux *Salmonella* (pyranoside ou furanoside). Le fait qu'un même sucre terminal ne détermine que de très faibles réactions croisées entre deux polysides (inobservables même avec les sérums de lapins faiblement immunisés) n'est pas nouveau. On sait, en particulier, qu'il existe un fucose terminal sur les polysides spécifiques des groupes sanguins A et H [2, 29] et, jusqu'à présent, on n'a pas observé de réactions croisées entre ces deux polysides.

c) *Rôle de l'espèce et de l'individu sur le comportement des anticorps.* — C'est un lieu commun de constater les différences entre la spécificité des anticorps fabriqués par deux animaux d'espèces différentes ou de même espèce. Dans le cas des sérums anti-*S. typhi*, ce fait a déjà été souligné [34]. Ici la connaissance de la composition chimique partielle de quelques antigènes O du tableau de Kauffmann-White apporte de nouvelles données sur ces différences.

La réaction croisée entre *S. newport* et *S. paratyphi* B n'a pu être étudiée qu'avec les sérums de cheval qui seuls étaient précipités par le polyside hétérologue. La très faible agglutination croisée de nos sérums de lapin était due à une longue immuni-



sation ; chez des animaux immunisés plus faiblement, on n'observe pas en général de réaction croisée, ce qui explique l'individualité des antigènes 4 et 8 (tous deux possédant un abéquose terminal) dans le tableau de Kauffmann-White. Si donc on accepte la seconde explication proposée pour la réaction croisée partielle entre ces antigènes (abéquose, seul sucre commun entre les deux chaînes oligosidiques), il faut penser que le cheval fabrique plus facilement que le lapin les anticorps spécifiques du sucre terminal. Ceci serait aussi en bon accord avec le fait qu'il est en général plus facile d'inhiber par le seul sucre terminal la précipitation des anticorps de cheval que celle des anticorps de lapin (tableaux II et IV). Ceci expliquerait enfin l'impossibilité d'obtenir des sérums spécifiques anti-*E. coli* chez le cheval, même après une courte immunisation, alors que c'est chose facile chez le lapin [23]. On a constaté en effet que deux espèces distinctes de *E. coli* (O 111 : B4 et O 55 : B5) possédaient le même colitose terminal [24].

Les variations à l'intérieur d'une même espèce, illustrées encore récemment par Kabat [47] à propos des anticorps anti-dextrane, se retrouvent dans cette étude, puisque les résultats de l'inhibition par les différents sucres simples sont absolument différents entre les deux sérums de cheval anti-*S. typhi* (tableau II) ainsi qu'entre les deux sérums de cheval anti-*S. paratyphi* B (tableau IV).

#### RÉSUMÉ.

L'étude de l'inhibition au moyen de sucres simples des précipitations homologues et croisées des sérums anti-*Salmonella* par les polyosides spécifiques extraits de ces germes a permis d'établir la nature des sucres terminaux partiellement responsables de la spécificité des antigènes 1, 2, 4, 8, 9, 12 et 35 du schéma de Kauffmann-White.

Parmi ces sucres, les 3-6 didésoxyhexoses, récemment découverts, jouent un rôle prépondérant. Le rôle du tyvélose (3-6 didésoxy-D-mannose) dans la spécificité de l'antigène 9 du groupe D a été confirmé ; l'abéquose (3-6 didésoxy-D-galactose) joue le même rôle à l'extrémité de l'antigène 4 du groupe B, le colitose (3-6 didésoxy-L-galactose) à l'extrémité de l'antigène 35 du groupe P.

La complexité immunologique de l'antigène 12 (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) se traduit par la présence de deux chaînes latérales terminées l'une par le rhamnose et l'autre par le glucose.

On a discuté le rôle du paratose (3-6 didésoxy-D-glucose) terminal dans la spécificité de l'antigène 2 des *Salmonella* du groupe A, ainsi que celui de l'abéquose terminal de l'antigène 8 du groupe C<sub>2</sub> et l'on a établi le rôle de cet abéquose terminal



dans les très légères réactions croisées observées parfois entre l'antigène 4 du groupe B et l'antigène 8 du groupe C<sub>2</sub>.

L'étude de la précipitation croisée des sérums anti-*S. paratyphi* B par les galactomannanes a permis d'attribuer à l'antigène 4 la chaîne oligosidique suivante : abéquose-galactose-mannose.

La portée de ces résultats a été discutée du point de vue bactériologique (tableau de Kauffmann-White) et immunologique : rôle des groupements polaires ou non dans la spécificité des sucres terminaux, réactions croisées, rôle de l'espèce et de l'individu sur la spécificité des anticorps.

*En conclusion*, ces résultats permettent d'apporter des bases chimiques à la classification de Kauffmann-White, établie sur des données purement sérologiques, et d'expliquer le mécanisme de certaines réactions croisées observées entre les *Salmonella*. Ils laissent entrevoir la possibilité d'une nouvelle méthode de préparation des sérums spécifiques, moins fastidieuse que les absorptions utilisées actuellement.

Nous tenons à remercier le D<sup>r</sup> Bonnefoi (Chef du Service des Vaccins, Institut Pasteur, Paris) pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail, le D<sup>r</sup> Davies (Microbiological Station, Porton, Angleterre) à qui nous devons les polysides de *S. niloese* et *S. newport*, le professeur Hough (University of Bristol, Angleterre) qui nous a donné les galactomannanes de la luzerne et du trèfle, le professeur Kauffmann (Centre International des *Salmonella*, Copenhague) pour la souche de *E. coli* et pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail, M. R. Lamy (Institut Pasteur, Paris) qui a dirigé l'immunisation des chevaux, le professeur Lederer (Institut de Biologie physico-chimique, Paris) à qui nous devons l'ascarylose et le tyvélose synthétique, le D<sup>r</sup> Le Minor (Institut Pasteur, Paris) qui nous a fourni la plupart des souches, le sérum de cheval anti-*E. coli* et les renseignements bactériologiques qui nous furent précieux, enfin le D<sup>r</sup> Stocker (Lister Institute, Londres) qui nous a fourni les germes secs de *S. paratyphi* A var. *durazzo*.

## SUMMARY

### IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *Salmonella*.

#### V. ROLE OF CERTAIN SUGARS, PARTICULARLY 3-6 DIDESOXYHEXOSES, IN THE SPECIFICITY OF KAUFFMANN-WHITE O ANTIGENS.

Studies of inhibition by simple sugars of homologous and cross precipitations of anti-*Salmonella* sera by specific polysaccharides allow us to establish the nature of the terminal sugars, partially

responsible for the specificity of 1, 2, 4, 8, 9, 12 and 35 Kauffmann-White O antigens.

Amongst these sugars the newly discovered 3-6 dideoxyhexoses play a preponderant role. The role of tyvelose (3-6 dideoxy-D-mannose) in the specificity of group D antigen 9 has been confirmed; abequose (3-6 dideoxy-D-galactose) plays the same role at the end of group B antigen 4, as well as colitose (3-6 dideoxy-L-galactose) at the end of group P antigen 35.

The immunological complexity of antigen 12 (12<sub>1</sub>, 12<sub>2</sub>, 12<sub>3</sub>) corresponds with the presence of two side chains, one terminating in rhamnose, the other in glucose.

The role played by the terminal paratose (3-6 dideoxy-D-glucose) in the specificity of group A antigen 2 is discussed as well as the role of the terminal abequose in group C<sub>2</sub> antigen 8. The role of this abequose in the very weak cross precipitations sometimes observed between group B antigen 4 and group C<sub>2</sub> antigen 8 is established.

The study of the cross precipitations of anti-*S. paratyphi* B sera by galactomannans allows us to deduce the presence of the oligosaccharidic chain « abequose-galactose-mannose » in antigen 4.

The importance of these results is discussed both from the bacteriological (Kauffmann-White table) and the immunological point of view (role of polar and apolar groups in the specificity of terminal sugars, cross reactions, role of species and individual on antibodies specificity).

*In conclusion* : These results afford some chemical basis to the Kauffmann-White table, established only on serological data; they explain the mechanisms of some cross reactions between *Salmonella*; they suggest that it would be possible to prepare specific sera by a method less cumbersome than the present absorption methods.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVERY (O. T.), GOEBEL (W. F.) et BABERS (F. H.). *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 769. — GOEBEL (W. F.) AVERY (O. T.) et BABERS (F. H.). *J. exp. Med.*, 1934, **60**, 599.
- [2] BRAY (H. G.), HENRY (H.) et STACEY (M.). *Biochem. J.*, 1946, **40**, 124.
- [3] COMBES (R.), STAUB (A. M.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 75.
- [4] COURTOIS (J.). *Exp. Ann. Bioch. Med.*, 1948, **9**, 225. — FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). 8<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay. A. Stoops, édit., Bruxelles, 1950, 270.
- [5] DAVIES (D. A. L.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 700.
- [6] DAVIES (D. A. L.), STAUB (A. M.), FROMME (I.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). *Nature*, 1958, **181**, 222.

- [7] FOUQUEY (C.), LEDERER (E.), LÜDERITZ (O.), POLONSKY (J.), STAUB (A. M.), STIRM (S.), TINELLI (R.) et WESTPHAL (O.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 2417.
- [8] FOUQUEY (C.), POLONSKY (J.), LEDERER (E.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *Nature*, 1958, **182**, 944.
- [9] FOUQUEY (C.), POLONSKY (J.) et LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 315.
- [10] FREEMAN (G. G.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 340.
- [11] GOODMAN (J. W.) et KABAT (E. A.). *Feder. Proc.*, 1957, **16**, 415.
- [12] HEIDELBERGER (M.) et CORDOBA (F.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 375.
- [13] HEIDELBERGER (M.). *Ann. Rev. Biochem.*, 1956, **25**, 641.
- [14] HEIDELBERGER (M.) et coll. *J. Immunol.*, 1957, **78**, 419, 427 et 431 ; *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 113, 116 et 1135.
- [15] ISEKI (S.) et KASHIWAGI (K.). *Proc. Jap. Acad.*, 1955, **31**, 558.
- [16] JONES (J. K. N.) et PERRY (M. B.). *J. Am. chem. Soc.*, 1957, **79**, 2787.
- [17] KABAT (E. A.). *Revue Hématol.*, 1957, **12**, 606 ; *J. cell. comp. Physiol.*, 1957, **50**, Suppl. 1, 79.
- [18] KABAT (E. A.). *J. Am. chem. Soc.*, 1954, **76**, 3709.
- [19] KARUSH (F.). *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, Sect. II, 1958, **20**, 581.
- [20] W. KNAPP. *Z. Bakt. Or. I*, 1955, **164**, 57.
- [21] KAUFFMANN (F.), LÜDERITZ (O.), STIERLIN (H.), WESTPHAL (O.) [en préparation].
- [22] LANDSTEINER (K.). *The specificity of serological reactions*, Havard Univ. Press., 1946.
- [23] LE MINOR (L.) [communication personnelle].
- [24] LÜDERITZ (O.) et STAUB (A. M.) [résultats inédits].
- [25] LÜDERITZ (O.), STAUB (A. M.), STIRM (S.) et WESTPHAL (O.). *Biochem. Z.*, 1958, **330**, 193.
- [26] MARRACK (I. R.) et ORLANS (E. S.). *Progress in Stereochem.*, 1958, **2**, 228.
- [27] MC CARTY (M.) et LANCEFIELD (R. C.). *J. exp. Med.*, 1955, **102**, 11. — MC CARTY (M.). *Ibid.*, 1956, **104**, 629.
- [28] MIKULASZEK (E.). *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1954, **11**, 101 et *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, suppl., 40.
- [29] MORGAN (W. T. J.) et WATKINS (W.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **84**, 94.
- [30] NISONOFF (A.) et PRESSMAN (D.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 417.
- [31] PON (G.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1132.
- [32] PON (G.). *Thèse Fac. Pharm.*, Paris, 1953. — PON (G.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 1283.
- [33] a) MEYER (K.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 282 ; b) NAKAYA (R.) et FUKUMI (H.). *Jap. J. med. Sci.*, 1953, **6**, 17 ; c) STAUB (A. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 618.
- [34] STAUB (A. M.) et DAVARPANAH (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 338.
- [35] STAUB (A. M.) et PON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 441.
- [36] STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, suppl. I, 65.

- [36 a] STAUB (A. M.), TINELLI (R.), WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *VII<sup>e</sup> Congrès Microb.*, Stockholm, 1958, p. 115. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), STIRM (S.), STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Ibid.*, p. 98. — TINELLI (R.) et STAUB (A. M.). *IV<sup>e</sup> Congrès Chim. biol.*, Vienne, 1958, p. 194.
- [37] TALMAGE (D. W.). *J. Cell. comp. Physiol.*, 1957, **50**, suppl. 1, 229.
- [38] TINELLI (R.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.* (en préparation).
- [39] UETAKE (H.) et NAKAMO (W.). *Jap. Med. J.*, 1949, **2**, 109.
- [40] WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.) et BISTER (F.). *Z. Naturforsch.*, 1952, **7 b**, 148. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) et KEIDERLING (W.). *Ibid.*, 1952, **7 b**, 536.
- [41] WESTPHAL (O.). *Angew. Chem.*, 1952, **64**, 314. — WESTPHAL (O.), LÜDERITZ (O.), FROMME (I.) et JOSEPH (N.). *Angew. Chem.*, 1953, **65**, 555. — WESTPHAL (O.) et LÜDERITZ (O.). *Angew. Chem.*, 1954, **66**, 407.
- [42] WHITE (B.). *Report Med. Res. Counc.*, 1926, **103**, 99.
- [43] WHISTLER (R. L.) et SMART (C. L.). *Polysaccharide Chemistry*, Acad. Press N. Y., 1953.
-

# **DÉTOXICATION ET PURIFICATION DU SÉRUM ANTI-VIRUS DE CARRÉ ÉQUIN OBTENU PAR INJECTION D'ORGANES VIRULENTS DE FURET**

par F. YEU et P. RECLARD (\*)

(avec la collaboration technique de D. PAVAGEAU et J.-M. BOUTRY).

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches)*

Le sérum anti-virus de Carré préparé à l'Institut Pasteur sur le cheval, au moyen d'organes virulents de furet, s'est avéré, après plusieurs mois d'injections d'entretien, toxique pour le chien. Cette toxicité se manifeste sous forme de larges œdèmes, de placards hémorragiques, d'escarres au point d'injection, et entraîne quelquefois la mort de l'animal.

Néant, dans une communication à la Société Vétérinaire Pratique [1], a exposé une technique permettant de neutraliser le pouvoir toxique de ce sérum hétérologue en y adjoignant, juste avant l'injection, dans la seringue même, une égale quantité de sérum anti-virus de Carré homologue. Dans 22 cas traités par ce mélange, Néant n'a observé aucun des accidents décrits ci-dessus. D'après cet auteur « il semble qu'il existe dans le sérum hétérologue anti-virus de Carré une substance toxique — sans rapport avec une substance anaphylactisante — qui se trouve inhibée par adjonction de sérum homologue ».

Au terme de cette communication, Nicol conclut : « Au fur et à mesure que l'hyperimmunisation de nos chevaux se prolongeait, des propriétés nouvelles et inattendues étaient apparues dans le sérum ; alors que le cobaye le supportait toujours à haute dose, il était devenu toxique pour le chien et pour le chien seul... Que s'était-il passé ? Le sérum était devenu « anti-chien », parce que la parenté zoologique entre le furet et le chien était plus proche que nous ne l'avions supposé. Les réactions sont dues à l'apparition dans le sérum d'un anticorps spécifique. D'autres sérums hétérologues d'origine équine, sérum antitétanique et antidiphtérique, par exemple, ne donnent chez le chien rien de semblable ».

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

La technique d'utilisation de ce sérum hétérologue toxique, communiquée par Néant, présente, certes, un grand intérêt ; mais il était indispensable que des recherches soient poursuivies afin d'obtenir, d'une part, un sérum hétérologue non toxique et, d'autre part, la détoxication du sérum toxique.

Comme l'annonce Nicol au cours de la discussion issue de cette communication, un nouveau sérum anti-virus de Carré hétérologue, aussi actif que le précédent, a été obtenu à l'aide d'un antigène avianisé ; ce sérum ne provoque plus de phénomène toxique chez le chien.

Notre rôle fut d'étudier la détoxication du sérum anti-virus de Carré hétérologue toxique.

Depuis longtemps, de nombreux auteurs avaient observé l'action protectrice des sérums homologues vis-à-vis de certains phénomènes toxiques ; c'est ainsi que Wells [2], dès 1906, constatait que le sérum de chien inhibe l'autolyse du foie de chien à un très haut degré, et que cette propriété est détruite par un chauffage à 80°, pendant trente minutes. Ces observations ont été confirmées par Longcope [3], en 1908 ; cet auteur constatait de même que l'albumine de l'œuf possède un faible pouvoir protecteur. Le sérum des femelles pleines serait plus efficace que le sérum d'individus normaux ; c'est ainsi que Willheim et Szandicz [4] ont constaté que les sérums des femelles gravides ont, seuls, une action empêchante spécifique sur la dégradation autolytique des cellules placentaires non chauffées.

Jaumain, en 1923 [5], a obtenu la détoxication d'un sérum de bœuf, en mélangeant ce dernier, à parties égales, au sérum d'un animal sensible, le cobaye ; ce mélange est maintenu à l'étuve durant deux heures, puis à la glacière durant une nuit ; la fraction liquide obtenue par centrifugation ne provoque plus d'accidents toxiques. L'injection au cobaye du précipité émulsionné dans l'eau physiologique n'apporte aucune réaction. Si l'on remplace le sérum de cobaye par de l'eau physiologique, l'animal meurt cinq à dix minutes après l'injection du mélange.

Jaumain signale d'autre part que le sérum de cobaye, chauffé à 56°, perd en grande partie son pouvoir protecteur.

Si les résultats obtenus par Jaumain et Néant sont identiques, il faut cependant souligner que la technique mise au point par ce dernier auteur est infiniment plus rapide et plus pratique.

De nombreux auteurs ont étudié l'atténuation ou la perte de la toxicité sous l'action de différents facteurs physico-chimiques ; on sait depuis fort longtemps que la toxicité d'un sérum s'atténue par vieillissement, par chauffage, par congélation suivie de décongélation (Osborne [6]), par action du vide (Lumière et Couturier [7]). Wells [2], Lumière et Grange [8] constatent une



atténuation de la toxicité lorsqu'on élève le pH. Doerr et Pick [9], Aronson [40] signalent la disparition des phénomènes toxiques par action de certaines substances adsorbantes. Selon d'autres auteurs, l'alcool, l'éther, certains organes broyés, ainsi que la dialyse ou la filtration sur bougie, apporteraient une atténuation ou une disparition de la toxicité.

Au cours de nos essais personnels sur d'autres sérums, nous avons constaté que, si certaines protéines anticorps demeuraient stables sous l'action de la chaleur, ou des variations de pH, ou de certaines substances adsorbantes, d'autres protéines anticorps, contenues dans le même sérum, étaient par contre labiles.

Nous avons étudié successivement sur le sérum anti-virus de Carré toxique : le fractionnement par le sulfate d'ammoniaque, l'action de la chaleur, puis l'action en milieu alcalin de divers charbons actifs (1).

Les échantillons obtenus ont été titrés par la technique de déviation du complément, vis-à-vis de deux antigènes différents : virus extrait de rates de furets infectés, et virus avianisé récolté sur membranes chorio-allantoïdiennes d'œuf de poule.

Les essais de toxicité ont été effectués sur le chien par injection intradermique de 0,25 cm<sup>3</sup> de chaque échantillon ; nous avons pu comparer ainsi sur un même animal, les réactions provoquées par des sérums obtenus au cours de différents essais, aux phénomènes toxiques du témoin. Lorsque la réaction intradermique était nulle, nous contrôlions alors l'atoxicité de l'échantillon par injection sous-cutanée de 10 cm<sup>3</sup>. En dernier lieu, nous avons éprouvé sur le furet le pouvoir neutralisant du sérum détoxiqué, vis-à-vis du virus.

#### I. — FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIAQUE.

Dès 1953 nous avons déterminé le pourcentage en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, qui précipite la totalité des anticorps anti-virus de Carré ; nous avons effectué les fractionnements par 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, à pH 6,4-6,6. Les précipités et les surnageants correspondants avaient été titrés, après dialyse, par la technique de congutination (2). Les résultats montraient qu'à 28 p. 100 de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,

(1) Nous exprimons tous nos remerciements aux Etablissements CECA, qui ont mis gracieusement à notre disposition différents échantillons d'Acticarbone.

(2) Nous exprimons toute notre gratitude à notre collègue le Dr R. Corvazier qui, avec la collaboration du Dr E. Lasfargues, a adapté la technique de congutination au titrage du virus de Carré (« La congutination, méthode de détection du virus de Carré », *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 676) et a effectué tous ces titrages.

la totalité des anticorps anti-virus de Carré était entraînée dans le précipité et constituait ce que nous appelons la « fraction anticorps » (fig. 1 et 2).

## II. — ACTION DE LA CHALEUR.

Le chauffage à 62° du sérum brut dilué au 1/2 produit une opalescence; l'injection intradermique de 0,25 cm<sup>3</sup> de ce sérum opalescent provoque de fortes réactions cutanées, mentionnées dans le tableau I.

La présence de 7 p. 100 de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, au cours du chauffage à 62°, durant trente minutes, permet d'obtenir un sérum limpide, mais dont le pouvoir irritant demeure (tableau II).

## III. — ACTION DES « CHARBONS ACTIFS ».

Nous avons étudié le pouvoir adsorbant de charbons actifs de différentes qualités : 2S, 3S, SA, 2SA; tous les essais ont été effectués dans les mêmes conditions : après dilution du sérum brut au 1/2, puis addition de 10 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, on fait agir le kaolin et le charbon à proportions égales, à pH 8,7, durant trente minutes à 62°.

Les essais diffèrent par la qualité et par la quantité de charbon; certains ont subi, après l'action du charbon, le fractionnement par 28 p. 100 en poids SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, à pH 6,6.

FIG. 1. — Electrophorèse, après dialyse, des fractions de sérum anti-virus de Carré, précipitées, et non précipitées par différents pourcentages de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> : 1. Sérum brut anti-virus de Carré; 2. Fraction non précipitée par 14 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 3. Fraction précipitée par 14 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 4. Fraction non précipitée par 16 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 5. Fraction précipitée par 16 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 6. Fraction non précipitée par 18 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 7. Fraction précipitée par 18 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 8. Fraction non précipitée par 20 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 9. Fraction précipitée par 20 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 10. Fraction non précipitée par 22 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 11. Fraction précipitée par 22 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

FIG. 2. — Electrophorèse, après dialyse, des fractions de sérum anti-virus de Carré, précipitées, et non précipitées par différents pourcentages de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> : 12. Fraction non précipitée par 24 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 13. Fraction précipitée par 24 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 14. Fraction non précipitée par 26 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 15. Fraction précipitée par 26 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 16. Fraction non précipitée par 28 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 17. Fraction précipitée par 28 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 18. Fraction non précipitée par 30 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 19. Fraction précipitée par 30 p. 100 en poids de de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 20. Fraction non précipitée par 32 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 21. Fraction précipitée par 32 p. 100 en poids de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 22. Sérum brut anti-virus de Carré.

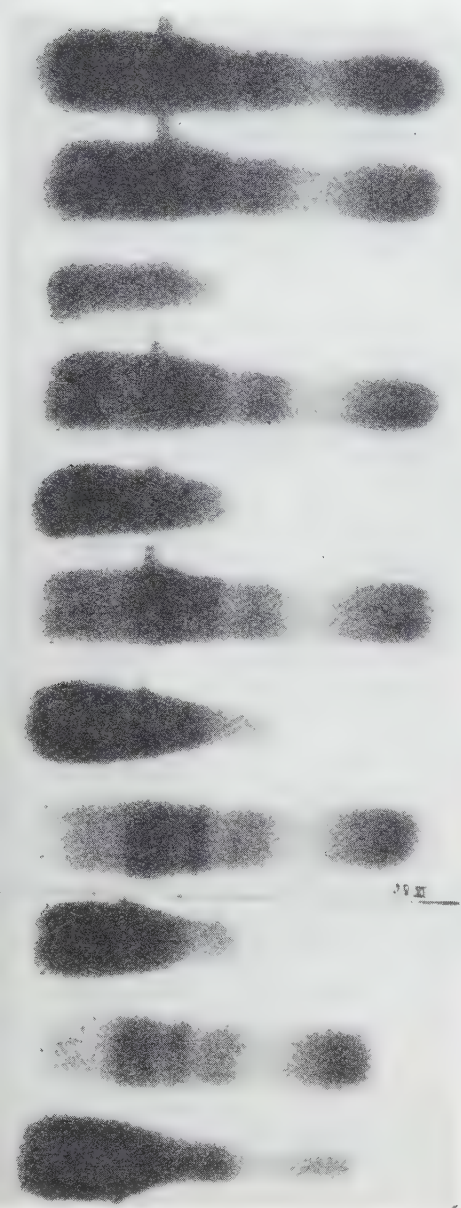


FIG. 1.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

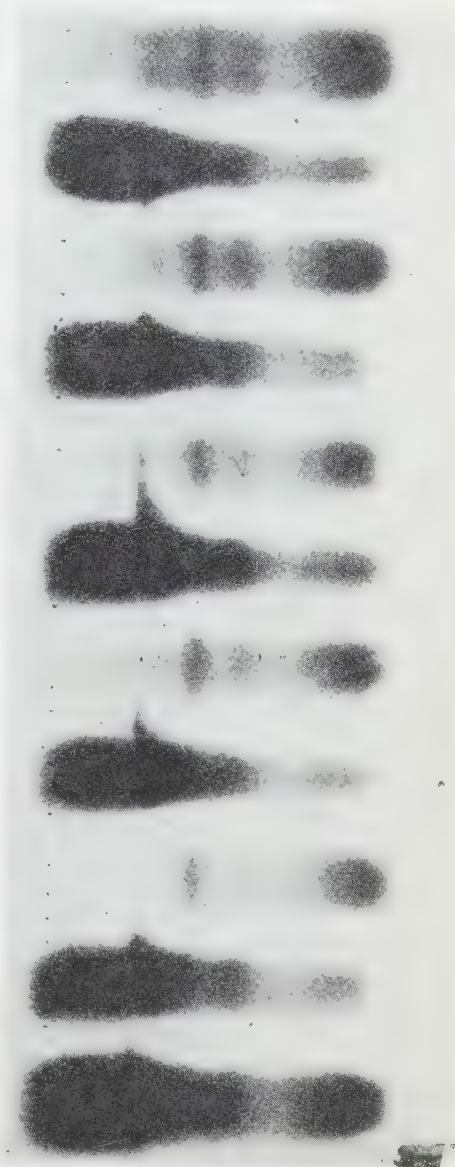


FIG. 2.

TABLEAU I. — Sérum chauffé à 62°.

Chiens d'expérience	CHASSE		ZIMMY		DIANE	
	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin
Observations après	+++	+++	++	+++	++	+++
24H	escarre	escarre		escarre		
48H	+++	+++	++	+++	-	+++ escarre
96H	+++	+++	+++	+++	-	+++
120H	++	+++ abcès	++	+++ escarre abcès	-	++

TABLEAU II. — Sérum chauffé à 62° en présence de 7 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expérience	CHASSE		ZIMMY		DIANE	
	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin
Observations après	+++	+++	+++	+++	++	+++
24H	infecté	escarre	escarre	escarre		
48H	+++ abcès	+++	+++	+++	+++	+++ escarre
96H	+++ abcès	+++	+++	+++	++	+++
120H	+++ abcès	+++ abcès	++	+++ escarre abcès	+	++

TABLEAU III. — Charbon 2S : 5 g par litre.  
Sans fractionnement et après fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience	CHASSE			ZIMMY			DIANE		
	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin
24H	++	+	+++ escarre	+	-	+++ escarre	++	++	+++
48H	+++	+	+++	+	-	+++	+	+++	+++ escarre
96H	++	-	+++	-	-	+++	-	+	+++
120H	++	-	+++ abcès	-	-	+++ escarre abcès	-	indur- ation	++

Les réactions, après injections intradermiques des sérums ainsi obtenus, sont résumées dans les tableaux III et IV.

Le sérum obtenu après fractionnement s'avère moins toxique que le sérum n'ayant pas subi ce fractionnement, à l'exception

de Diane, qui n'a cependant donné qu'une simple induration après cent vingt heures.

D'après les résultats mentionnés dans les tableaux III et IV, nous pouvons conclure que :

a) L'action détoxiquante du charbon 2S est sensiblement identique à celle du charbon 3S.

b) Les sérums fractionnés par 28 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  se sont montrés moins toxiques sur les trois chiens d'expérience que les sérums non fractionnés.

TABLEAU IV. — Charbon 3S : 5 g par litre.  
Sans fractionnement et après fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience	CHASSE			ZIMMY			DIANE		
	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin	Sans frac- tion	Après frac- tion.	Témoin
24H	++	+	+++ escarre	+	-	+++ escarre	+	++	+++
48H	+++	+	+++	+	-	+++	+	+	+++ escarre
96H	+++	-	+++	-	-	+++	+	-	+++
120H	++	-	+++ abcès	-	-	+++ abcès	-	-	++

TABLEAU V. — Charbons SA et 2SA : 5 g par litre et 10 g par litre.  
Avec fractionnement par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Chiens d'expé- rience	DIANE					JEUNE				
	SA		2SA		Témoin	SA		2SA		Témoin
Observation après	5%	10%	5%	10%		5%	10%	5%	10%	
24H	-	-	+	-	+++ escarre	+	+	++	+	+++ escarre
48H	-	-	+	-	+++ escarre	+	+	+	+	+++ escarre
72H	-	-	-	-	+++ escarre	-	-	-	-	+++ escarre
84.	-	-	-	-	+++ escarre	-	-	-	-	+++ escarre

Les résultats groupés dans le tableau V montrent que, si dans l'utilisation des charbons neutres SA, 2SA les facteurs qualité et quantité ne jouent qu'un faible rôle, le pouvoir détoxiquant de ces charbons est cependant supérieur à celui des charbons 2S et 3S. Il faut remarquer que l'utilisation de certains charbons offre de grandes difficultés pratiques (filtration, légère opalescence...) ; nous avons choisi le charbon SA, qui, dans les proportions de



5 p. 1 000, nous a permis d'obtenir un sérum totalement détoxiqué, parfaitement limpide, de préparation simple.

Si l'action séparée de chacun des facteurs étudiés ne détoxique que partiellement le sérum, l'association de tous ces facteurs permet une détoxication totale.

Le fait que le fractionnement par 28 p. 100 de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  soit indispensable pour obtenir un sérum totalement détoxiqué permet de penser que les protéines toxiques seraient réparties à la fois sur la « fraction anticorps » et sur la « fraction non anticorps » : les protéines toxiques de la « fraction anticorps » étant thermolabiles et sensibles à l'alcalinité et aux adsorbants ; celles de la « fraction non anticorps » restant stables vis-à-vis de ces mêmes agents physico-chimiques et conservant leur caractère toxique. Cela explique la nécessité d'éliminer la « fraction non anticorps » et de poursuivre la détoxication sur la « fraction anticorps » seule.

Pour détoxiquer le sérum anti-virus de Carré équin, obtenu à partir d'organes virulents de furet, nous avons adopté la technique suivante :

La « fraction anticorps » est obtenue en précipitant le sérum brut dilué au 1/2 par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , à pH 6,4-6,6 ; ce précipité est repris par de l'eau distillée de manière à obtenir une solution d'anticorps contenant 10 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

En présence de 5 p. 1 000 de kaolin et de 5 p. 1 000 de charbon SA, on chauffe le sérum durant trente minutes à 62°, le pH étant ajusté à 8,7. Après filtration les anticorps sont à nouveau précipités par addition de 18 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Le précipité donne, après dialyse, un sérum que l'on traite par un gel de phosphate tricalcique [41]. Ce sérum détoxiqué et purifié est parfaitement limpide et filtre aisément à travers une membrane stérilisante ; injecté par voie sous-cutanée sous le volume de 10 cm<sup>3</sup>, il ne provoque plus de phénomène toxique chez le chien ; il neutralise, par centimètre cube, 20 000 doses minima mortelles de virus pour le furet. Le titre de ce sérum est environ le double de celui du sérum brut, leurs taux en protéines étant très voisins ; le taux de purification est donc sensiblement égal à 2 ; le rendement est de 50 p. 100 environ.

L'image électrophorétique du sérum anti-virus de Carré ainsi obtenu est sensiblement identique à celle d'un sérum purifié antidiphthérique ou antitétanique. Toutefois, dans le cas du sérum anti-virus de Carré, la tache des globulines anticorps est située au niveau de la globuline T de van der Scheer, tandis que les anticorps ayant subi l'action enzymatique de la pepsine migrent à la vitesse des  $\gamma$ -globulines ; cette propriété est particulièrement mise

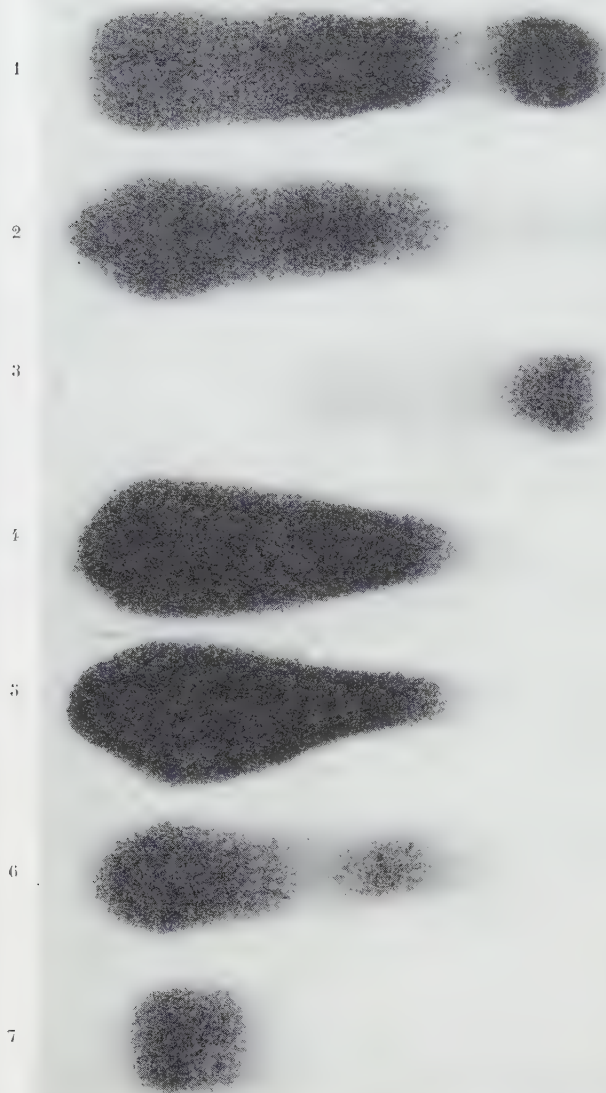


FIG. 3. — Electrophorèse : 1. Sérum brut anti-virus de Carré. 2. Fraction de sérum anti-virus de Carré, précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (fraction anticorps), dialysée ; 3. Fraction de sérum non précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (fraction non-anticorps) dialysée ; 4. Sérum anti-virus de Carré, purifié, non détoxiqué ; 5. Sérum anti-virus de Carré, purifié, détoxiqué ; 6. Sérum antidiphthérique purifié (ayant subi l'action enzymatique de la pepsine) ; 7. Sérum antidiphthérique purifié à partir du complexe antigène-anticorps (ayant subi l'action enzymatique de la pepsine).

en évidence dans le cas du sérum antidiphthérique purifié à partir du complexe antigène-anticorps [12, 13].

Notons que l'électrophorèse sur papier ne nous a pas permis de distinguer, au cours de nos essais, un sérum demeuré toxique après traitement, d'un sérum totalement détoxiqué (fig. 3).

#### RÉSUMÉ.

Le sérum anti-virus de Carré équin obtenu par injection d'organes virulents de furet s'est avéré toxique pour le chien plusieurs mois après le début de sa préparation. Nous avons réalisé la détoxication et la purification de ce sérum par action du charbon activé SA, à pH 8,7, à 62°, sur la fraction de sérum précipitée par 28 p. 100 en poids de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

Cette technique nous a permis d'obtenir un sérum purifié et détoxiqué, avec un rendement de 50 p. 100 environ et un taux de purification voisin de 2.

#### SUMMARY

DETOXICATION AND PURIFICATION OF HORSE ANTI-CARRÉ VIRUS SERUM, OBTAINED AFTER INJECTION OF FERRET VIRULENT ORGANS.

This serum has proved virulent for dogs several months after its preparation. The authors have carried out its detoxication and purification by means of activated SA carbon, at pH 8,7 and 62°, using the serum fraction precipitated by 28 % (dry weight) of  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

With this technique it is possible to obtain a purified and detoxified serum with a yield of about 50 % and a purification titre of about 2.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] NÉANT (M.). *Bull. Soc. vét. prat.*, 1957, **41**, 298.
- [2] WELLS (G.). *J. med. Res.*, 1906, **15**, 149.
- [3] LONGCOPE (W. T.). *J. med. Res.*, 1908, **18**, 45.
- [4] WILLHEIM (R.) et SZANDICZ (S.). *Biochem. Z.*, 1914, **65**, 219.
- [5] JAUMAIN (D.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 1213.
- [6] OSBORNE (W. A.). *Austral. J. exp. Biol.*, 1930, **7**, 225.
- [7] LUMIÈRE (A.) et COUTURIER (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 218.
- [8] LUMIÈRE (A.) et GRANGE (R. H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 681.
- [9] DOERR (R.) et PICK. *Z. Immunitätsf.*, 1913, **19**, 251.
- [10] ARONSON (J.). *J. Immunol.*, 1928, **15**, 465.
- [11] AMOUREUX (G.) et YEU (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 165.
- [12] YEU (F.) et PAVAGEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 240.
- [13] YEU (F.) et PAVAGEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 480.

# CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE

## II. — CULTURE DU VIRUS DE LA VACCINE

### SUR CELLULES ÉPITHÉLIALES DE REIN DE VEAU EN COUCHE MONOCELLULAIRE

par P. SUREAU et E. R. BRYGOO (\*)

(avec la collaboration technique de RAZAFIMAHATRATRA).

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : J. COURDURIER])

Nous poursuivons l'étude de la multiplication du virus vaccinal en culture de tissus dans le but d'obtenir un vaccin antivariolique dégagé des servitudes qui sont celles de tout vaccin vivant, produit par inoculation à l'animal.

Après avoir utilisé des cultures de cellules épithéliales de rein de lapin [1] nous employons maintenant le rein de veau. Le vaccin jennérien étant traditionnellement préparé sur jeune bovidé (génisse, ou bufflon, ou jeune zébu), il est plus logique d'utiliser des cultures de tissus de bovin que des cultures de tissus de lapin ; d'autre part, si l'on veut obtenir une quantité importante de cultures cellulaires en vue de la production de vaccin, le rein de veau présente, de par son volume, un avantage évident.

Le développement du virus vaccinal sur culture de cellules de rein de veau a été étudié par Warren et Cutchins [2], qui ont montré que le virus se multiplie rapidement et produit un effet cytopathogène au cours de passages répétés. Les mêmes auteurs ont proposé d'utiliser cet effet cytopathogène pour effectuer le titrage du vaccin antivariolique [3]. Enfin, Dostal [4] a utilisé des cultures de cellules trypsinées de rein de veau pour préparer un vaccin antivariolique exempt de germes.

#### I. — TECHNIQUES, MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° PRÉPARATION DU TISSU. — Les reins sont prélevés à l'abattoir sur des veaux sains, aussitôt après l'abattage. Après dissection, la corticale est hachée aux ciseaux et les fragments lavés trois fois dans une solution de P. B. S. (P. B. S. incomplet, sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium [5]).

2° TRYPSINATION. — Les fragments de corticale sont transvasés dans une fiole Fourneau de 500 ml et recouverts de trois fois leur volume

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 novembre 1958.

d'une solution de trypsine (Mann 1/300) à 0,25 p. 100 dans le P. B. S., préalablement réchauffée à 37° (300 ml environ sont nécessaires). Une prédigestion de trente minutes est faite à la température de 37° avec agitation constante sur agitateur magnétique. La trypsine est alors décantée et remplacée par un même volume de trypsine fraîche. La digestion proprement dite s'effectue ensuite à froid, selon la méthode de Bodian [6], en suivant la technique de Daniel et Depoux [7]. A la température de +4°, et en maintenant une agitation modérée constante, la digestion est complète en vingt heures.

3° PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE. — La suspension obtenue en fin de trypsination est recueillie en totalité dans un pot à centrifuger de 1 000 ml en la filtrant sur voile de nylon pour éliminer les déchets fibrineux. Après centrifugation de dix minutes à 1 000 t/mn, le liquide surnageant est aspiré et remplacé par du P. B. S. dans lequel les cellules sont remises en suspension par agitation. Deux lavages au P. B. S. sont effectués, suivis d'un lavage avec du milieu de culture, contenant des antibiotiques mais pas de sérum.

4° DILUTION, NUMÉRATION. — Le culot cellulaire finalement obtenu est mis en suspension dans le milieu de culture à raison de 6 à 8 ml par litre de milieu. La corticale d'un rein de veau fournit en moyenne 30 à 40 ml de culot cellulaire, permettant de préparer 5 l de suspension cellulaire. Les numérations faites à l'hématimètre, après coloration avec la solution acide citrique-cristal violet, donnent en moyenne 800 000 à 1 000 000 de cellules par millilitre de suspension.

5° MILIEU DE CULTURE. — Nous utilisons le milieu de Earle à l'hydrolysate de caséine, mis au point par Lépine et coll. [8, 9].

Le milieu est préparé sous forme concentrée dix fois, par fractions de 2 l (quantité suffisante pour 20 l de milieu dilué). Il est stérilisé par filtration sur bougie L3 et gardé à +4°, en flacons de 500 ml.

La solution de bicarbonate de soude-rouge de phénol est préparée à part sous forme non concentrée : solution à 4,4 p. 100 de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  et 0,04 p. 100 de rouge de phénol dans l'eau bidistillée. Stérilisation par filtration sur bougie L3.

Au moment de l'emploi, le milieu est dilué de la façon suivante :

Solution de Earle à l'hydrolysate de caséine, concentrée dix fois .....	100 ml
Solution de bicarbonate-rouge de phénol .....	50 ml
Eau bidistillée stérile .....	850 ml

On ajoute alors des antibiotiques :

Solution de pénicilline-streptomycine (contenant pour 1 ml 100 000 unités de pénicilline et 25 mg de streptomycine) .....	2 ml
Chloromycétine (solution à 50 mg/ml dans l'alcool absolu) .....	0,1 ml
Mycostatine (suspension à 50 mg/ml dans l'alcool absolu) .....	0,2 ml



Le pH est éventuellement ajusté à 7,2 par barbottage de gaz carbonique.

Ce milieu est additionné de sérum de veau (stérilisé par filtration sur disque Seitz et décomplémenté trente minutes à 56°) dans la proportion de 10 p. 100 pour le milieu de croissance et 2 p. 100 pour le milieu d'entretien.

6° PRÉPARATION DES CULTURES CELLULAIRES EN BOÎTES DE ROUX. — La suspension cellulaire est répartie dans des boîtes de Roux « Pyrex » de 1 000 ml à raison de 100 ml par boîte. Les boîtes, bouchées au caoutchouc, sont mises à incuber à l'étuve à 37°.

7° PRÉPARATION DES CULTURES EN TUBES. — Les cultures cellulaires en tubes Pyrex de 16 × 160 destinées aux titrages de virulence (et les cultures en tubes à lamelle destinées à faire des préparations colorées) sont préparées par trypsination de la couche cellulaire obtenue en boîtes de Roux. On utilise des cultures âgées de 8 à 15 jours, ayant subi un ou deux changements de milieu. La veille de la trypsination, le milieu est remplacé par du milieu de croissance frais (à 10 p. 100 de sérum). Après avoir enlevé ce milieu, on verse sur la couche cellulaire 25 ml d'une solution de trypsine à 0,25 p. 100 dans le P. B. S. Après quinze à vingt minutes environ de contact, avec agitation manuelle douce, les cellules sont décollées. Le liquide est aspiré et centrifugé cinq minutes à 1 000 t/min. Le culot cellulaire ainsi obtenu est mis en suspension dans du milieu de culture sans sérum et recentrifugé. Après ce lavage, le culot cellulaire est dilué dans 200 ml de milieu de culture (milieu de croissance contenant 10 p. 100 de sérum) en émulsionnant bien les cellules par pipettage répété. La suspension cellulaire obtenue est répartie à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont mis à incuber à 37°.

En trois jours environ, ces cultures-filles donnent une couche cellulaire complète, prête à utiliser.

8° CONSERVATION DES CULTURES A +4°. — Il est possible d'obtenir ces cultures cellulaires en tubes, destinées aux titrages, à des intervalles de temps variables et selon les besoins, en conservant à basse température les cultures cellulaires obtenues en boîtes de Roux. Cette conservation a été préconisée pour les cellules HeLa par Swim et Parker [40] et pour les cellules de rein de singe par Crawford [41]. Cette technique nous a donné avec les cellules de rein de veau de bons résultats. Des cultures en boîtes de Roux, âgées de 6 à 14 jours, ayant subi un ou deux changements de milieu sont utilisées pour cette conservation. Le milieu est renouvelé avant que les cultures soient placées au réfrigérateur à +4°/+6°. Après un délai qui a varié dans nos essais de huit à vingt-cinq jours les boîtes sont retirées du froid, le milieu est renouvelé, et les boîtes remises à incuber à 37°. En deux ou trois jours, les cellules forment à nouveau une couche cellulaire complète de cellules bien étalées, prêtes à être trypsinées en vue de la préparation de cultures en tubes.

9° TECHNIQUE D'INOCULATION DES CULTURES DE TISSUS. — a) Boîtes de Roux : le milieu de culture (100 ml) est enlevé, le liquide virulent

est inoculé à raison de 10 ml par boîte (si on inocule une série importante de boîtes, on utilise une seringue « Cornwall » de 10 ml). Les boîtes sont laissées à plat, immobiles pendant soixante minutes, à la température du laboratoire. Après ce contact, on ajoute à chaque boîte 90 ml de milieu d'entretien : milieu à l'hydrolysate de caséine contenant seulement 2 p. 100 de sérum. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°, stationnaires.

b) Tubes de 16 × 160 et tubes à lamelles : le milieu de culture est aspiré, le liquide virulent (pur ou dilué de 10 en 10 lors des titrages) est inoculé sous un volume de 0,2 ml. Après soixante minutes de contact, on ajoute dans chaque tube 1,8 ml de milieu d'entretien. Les tubes à lamelles sont remis à l'étuve, stationnaires ; les tubes de 16 × 160 sont placés dans un tambour tournant.

10° ORIGINE DU VIRUS UTILISÉ. — Nous avons utilisé comme source de virus vaccinal le vaccin antivariolique desséché de l'Institut de la Vaccine (Rue Ballu). Pour obtenir un produit bactériologiquement stérile, en vue de l'inoculation des cultures de tissus, cette lymphé desséchée a été diluée dans du liquide de Hanks additionné d'antibiotiques : 2 comprimés de 100 doses dans 100 ml de Hanks contenant : pénicilline, 100 000 U. ; streptomycine, 25 mg ; chloromycétine, 5 mg, et mycostatine, 10 mg. Cette suspension a été centrifugée huit minutes à 4 000 t/mn à la température de zéro degré ; le surnageant a été recentrifugé douze minutes à 6 000 t/mn, également à zéro degré. Le liquide virulent limpide ainsi obtenu, bactériologiquement stérile, a servi de souche de virus vaccinal pour l'inoculation des cultures cellulaires.

## II. — RÉSULTATS.

1° DÉVELOPPEMENT DES CULTURES CELLULAIRES. — Après trois jours d'incubation à 37°, les cellules sont collées au verre et surmontées d'un liquide limpide. La couche cellulaire est presque complète le septième jour. Le milieu est alors remplacé par du milieu de croissance neuf et les cultures remises à incuber jusqu'au neuvième jour. La couche cellulaire est alors complète et bien développée ; les cellules sont prêtes pour l'inoculation.

2° EFFET CYTOPATHOGENE PROVOQUÉ PAR LE VIRUS VACCINAL SUR CULTURES DE CELLULES DE REIN DE VEAU. — Les cultures cellulaires inoculées de virus vaccinal sont examinées microscopiquement

FIG. 1. — Cellules épithéliales de rein de veau normales (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

FIG. 2. — Effet cytopathogène provoqué par le virus vaccinal ; lésions ++ : plages claires bordées de cellules altérées (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

FIG. 3. — *Idem* ; lésions +++ : couche cellulaire dissociée, amas de cellules agglutinées en voie de lyse (cultures cellulaires examinées à l'état frais).

Fig. 1.

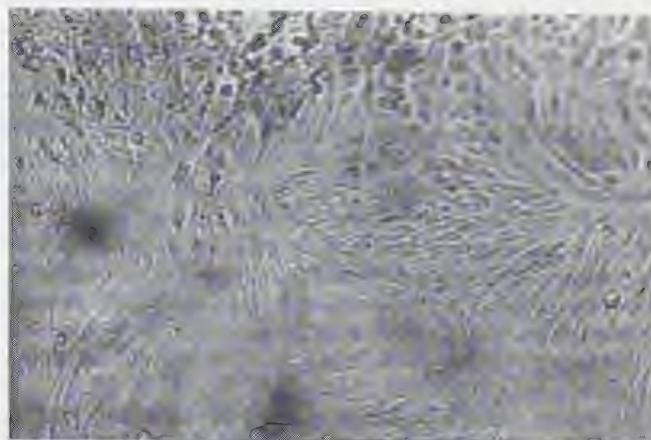


Fig. 2.

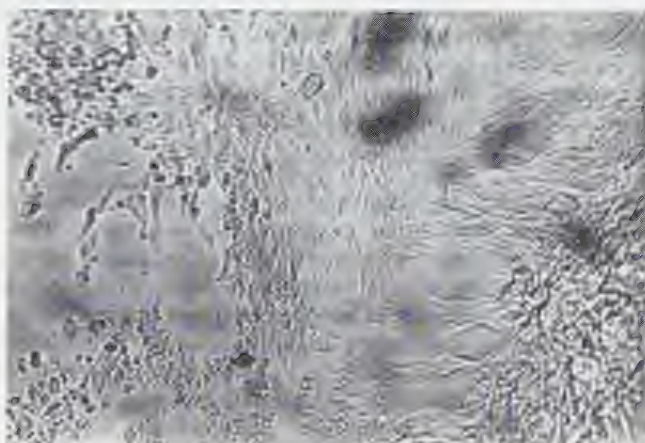
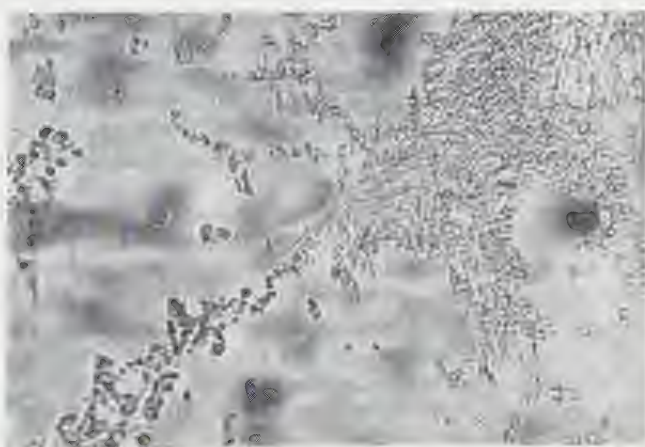


Fig. 3.



chaque jour. On observe un effet cytopathogène tout à fait comparable à celui qui se produit sur cellules de rein de lapin [1] : on voit d'abord apparaître, au sein de la couche cellulaire, des îlots de cellules granuleuses, arrondies et réfringentes (notation +) ; ces îlots deviennent plus nombreux et font bientôt place à des plages claires, bordées de cellules altérées (notation ++ ) ; ces plages de nécrose s'étendent et tendent à confluer, dissociant la nappe cellulaire (notation +++ ) ; enfin, la couche cellulaire est complètement dissociée et il ne reste plus que des amas de cellules agglutinées en voie de lyse, amas qui se détachent de la paroi de verre [notation ++++ ] (fig. 1, 2, 3).

Au cours de l'adaptation du virus vaccinal aux cultures de cellules de rein de veau, on a observé que cet effet cytopathogène tend à devenir de plus en plus précoce et intense : après quelques passages, le virus vaccinal donne des lésions notées ++ dès la vingt-quatrième heure, atteignant +++ dès le deuxième jour. Le liquide virulent est récolté le troisième jour quand les lésions atteignent ++++ et que les cellules sont presque complètement décollées.

3° COLORATION DE CULTURES EN TUBES A LAMELLES POUR MISE EN ÉVIDENCE DES INCLUSIONS CELLULAIRES. — Des cultures ont été inoculées avec des suspensions virulentes pures et diluées, puis colorées après des délais variables (douze, dix-huit, vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures) en même temps que des cultures-témoins. Les colorations utilisées ont été l'hémalum-éosine et le May-Grünwald-Giemsa. Cette dernière coloration nous a donné les préparations les plus caractéristiques [12]. Elle met en évidence, dans les cellules infectées de virus vaccinal, des inclusions cytoplasmiques éosinophiles de structure plus ou moins homogène et de taille variable, en général uniques, qui semblent correspondre aux corps de Guarnieri. Par contre, il nous a semblé impossible de considérer comme des corps élémentaires des granulations colorées en rouge au Giemsa, disséminées dans le cytoplasme, très nettement visibles, mais que l'on voit aussi, bien que rarement, dans les cellules rénales de veau non infectées de virus vaccinal.

4° TITRAGE DE VIRULENCE PAR DILUTION. — Les titrages de virulence des liquides récoltés se font par la recherche de la dilution limite donnant encore un effet cytopathogène. La suspension virulente à titrer est diluée de 10 en 10 dans du milieu de culture sans sérum. L'inoculum est de 0,2 ml ; on inocule cinq tubes par dilution. Après soixante minutes de contact, on ajoute à chaque tube 1,8 ml de milieu à 2 p. 100 de sérum. L'inoculum subit ainsi, au moment de l'inoculation, une dilution de  $10^{-1}$ .

Lors de ces titrages, on constate que l'effet cytopathogène est d'autant plus précoce que la concentration de l'inoculum est plus forte, et ceci de façon très régulière :  $10^{-1}$  : ++++ en deux jours ;  $10^{-2}$  : ++++ en trois jours ;  $10^{-3}$  : ++++ en quatre jours ;  $10^{-4}$  : ++++ en cinq jours ;  $10^{-5}/10^{-6}$  : ++++ en six jours ;  $10^{-7}/10^{-8}$  : ++++ en sept jours. Dans tous les cas, il s'écoule en moyenne trois jours entre l'apparition des premières lésions et la lyse cellulaire totale, pour une dilution donnée. Pendant toute la période d'observation des tubes du titrage, les tubes témoins, faits simultanément, ne doivent présenter aucune altération.

Le titre d'une suspension virulente est exprimé par le logarithme de la dilution qui donne encore un effet cytopathogène, pour un volume de 0,2 ml inoculé dans un tube de culture contenant 2 ml de milieu.

5° ADAPTATION DU VIRUS VACCINAL AUX CULTURES DE CELLULES DE REIN DE VEAU. PASSAGES EN SÉRIE. — Des passages en série du virus vaccinal sur cultures de cellules de rein de veau ont été effectués avec titrage de la virulence des liquides récoltés à chaque

TABLEAU I.

Inoculum	Log.dilution après inocu- lation.	Nombre de jours de culture		Produit récolté		Titrage DC/CT (1)
		du passage	total	Désignation		
Lymphe purifiée						$10^{-5}$
Lymphe purifiée	$10^{-1}$	3	3	VV/CRV 1er pass.		$10^{-4}$
VV/CRV (2) 1er pass.	$10^{-2}$	3	6	VV/CRV 2è pass.		$10^{-6}$
VV/CRV 2è pass.	$10^{-3}$	3	9	VV/CRV 3è pass.		$10^{-6}$
VV/CRV 3è pass.	$10^{-4}$	2	11	VV/CRV 4è pass.		$10^{-7}$
VV/CRV 4è pass.	$10^{-5}$	3	14	VV/CRV 5è pass.		$10^{-8}$
VV/CRV	$10^{-6}$	3	17	VV/CRV 6è pass.		$10^{-9}$
VV/CRV 6è pass.	$10^{-7}$	3	20	VV/CRV 7è pass.		$10^{-10}$

(1) DC/CT = Dose cytopathogène en culture de tissus (dilution limite donnant un effet cytopathogène après inoculation de 0,2 ml par tube de  $16 \times 160$  contenant 2 ml de milieu). (2) VV/CRV = Virus vaccinal en culture de rein de veau.



passage. Ces passages mirent en évidence la persistance de l'effet cytopathogène et, semble-t-il, une adaptation du virus aux cultures de rein de veau se traduisant par une élévation du titre de virulence. Les résultats de ces passages et de ces titrages sont résumés dans le tableau I.

#### CONCLUSIONS.

La multiplication du virus vaccinal est obtenue sur cultures de cellules de rein de veau. Il y a une adaptation du virus aux cultures cellulaires, qui se traduit par une augmentation du titre du virus récolté au cours des passages en série. Des travaux en cours portent sur l'utilisation éventuelle d'un tel virus vaccinal de culture comme vaccin antivariolique.

#### RÉSUMÉ.

Par trypsination à froid de rein de veau, des cultures de cellules épithéliales en couche monocellulaire sont obtenues dans un milieu à l'hydrolysat de caséine additionné de sérum de veau.

Sur ces cultures de tissus, la multiplication du virus vaccinal s'accompagne d'un effet cytopathogène caractéristique (en particulier, agglutination des cellules en voie de lyse). Cet effet cytopathogène est utilisé pour le contrôle de la multiplication du virus et le titrage de la virulence du virus récolté (dilution limite cytopathogène).

Cette technique de culture du virus vacinal sur cellules trypsinées de rein de veau permet d'obtenir de grandes quantités de virus hautement virulent.

#### SUMMARY

##### CULTURE OF VACCINIA VIRUS.

##### II. — CULTURE OF THE VIRUS ON MONOLAYER EPITHELIAL CALF KIDNEY CELLS.

Trypsination of calf kidney at low temperature allows to obtain monolayer epithelial cell cultures in Earle medium containing casein hydrolysate and calf serum. On these cultures, vaccinia virus induces a typical cytopathogenic effect (particularly agglutination of lysing cells). This cytopathogenic effect allows to follow the multiplication of the virus, and its titration.

With this technique, it is possible to obtain great amounts of highly virulent virus.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SUREAU (P.), DODIN (A.) et BRYGOO (E. R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 294.
  - [2] WARREN (J.) et CUTCHINS (E. C.). *Virology*, 1957, **4**, 297.
  - [3] CUTCHINS (E.) et WARREN (J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 456.
  - [4] DOSTAL (V.). *Behringwerk Mitteil.*, 1957, **33**, 111.
  - [5] BOURDIN (P.), ATANASIU (P.), LÉPINE (P.), JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 581.
  - [6] BODIAN (D.). *Virology*, 1956, **2**, 575.
  - [7] DANIEL (PH.) et DEPOUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 703.
  - [8] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (PH.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
  - [9] LÉPINE (P.), DANIEL (PH.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 567.
  - [10] SWIM (H. E.) et PARKER (R. F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 549.
  - [11] CRAWORD (J. G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 341.
  - [12] JUNTARO KAMAHORA et coll. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 43.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 8 janvier 1959.

Présidence de M. PRÉVOT.

## COMMUNICATIONS

### RECHERCHES SUR LA DIGESTION DE LA CELLULOSE CHEZ LE TERMITE *SPHAEROTERMES SPHAEROTHORAX*

par J. POCHON, H. DE BARJAC et A. ROCHE.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Si, depuis les travaux de B. Grassi et A. Sandrias en 1893, 1897, la digestion de la cellulose chez les termites ne fait aucun doute, son mécanisme, par contre, n'est pas encore parfaitement connu.

Nous avons entrepris l'étude du problème (1) avec un termite constructeur de meules sans champignons, *Sphaerotermes sphaerothorax*, de biologie très particulière (Grassé et Noirot) [1].

L'ensemencement de fragments de meules noires ou de meules claires sur milieu liquide, en anaérobiose, a montré l'existence de bactéries cellulolytiques anaérobies banales, *Clostridium* et *Plectridium*, du même type que celles trouvées dans le sol. L'ensemencement des mêmes fragments en aérobiose, sur silico-gel-papier, a également permis la culture de *Sporocytophaga* et de *Cellvibrio* telluriques.

Les analyses ayant porté sur le contenu du tube digestif ont donné des résultats bien différents et beaucoup plus intéressants.

L'examen microscopique direct, à l'état frais et après coloration, donne une image qui évoque une certaine ressemblance avec un contenu de panse de ruminant, au point de vue bactérien évidemment : très nombreux germes de petite dimension, dont certains mobiles, cocci et cocobacilles, le plus souvent non colorables par la méthode de Gram ; extrême rareté des grosses bactéries sporulées. Cependant certaines différences importantes sont à noter : ici, absence

(1) Sur la demande de MM. P.-P. Grassé et C. Noirot, qui nous ont fourni les termites vivants ainsi que les prélèvements de meules. Nous leur en exprimons toute notre gratitude.

de groupements streptococciques, à chaînettes courtes et bifurquées ou longues et flexueuses, abondances des spirilles, des spirochètes et des fusiformes (fig. 1).

Les essais de culture sur silico-gel-papier pour germes aérobies ont été négatifs, négatifs également avec un milieu liquide pour anaérobies cellulolytiques telluriques ; s'il existe une microflore cellulolytique, elle est donc spécialement adaptée au tube digestif hôte. Nous avons alors utilisé un milieu voisin de celui qui nous avait été favorable pour l'isolement de bactéries du tube digestif des rongeurs et des larves xylophages (Pochon, 1935, 1936, 1937 [2]) : extrait fécal, 100 ml ; extrait de terre, 100 ml ; eau distillée, 800 ml ; cellulose broyée ou feuille de papier filtre. Après ensemencement les tubes sont dés-aérés et scellés sous vide. La cellulose est attaquée en douze jours ; très nombreux cocci, surtout en groupements diplococciques, bâtonnets fins et granuleux, quelques vibrions ; très rares bactéries sporulées ou spores libres ; l'aspect des lames évoque une

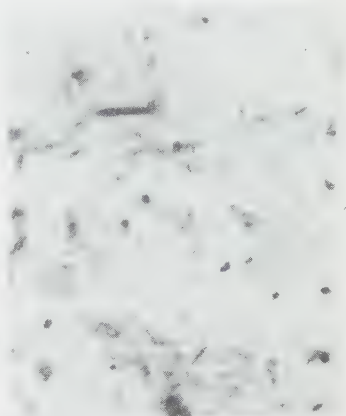


FIG. 1. — Frottis du contenu intestinal.

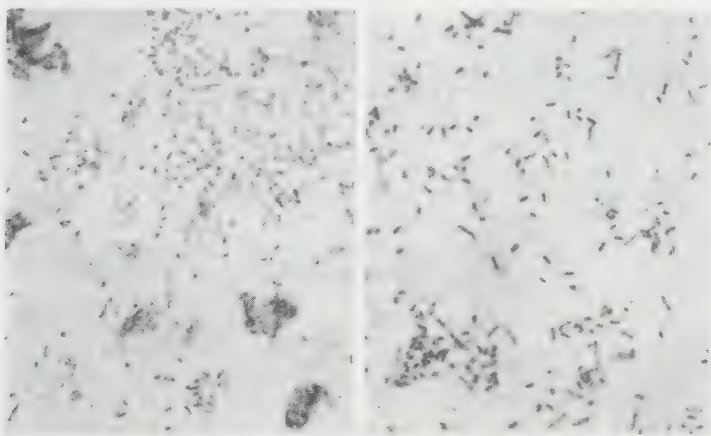


FIG. 2. — Microflore bactérienne cellulolytique non sporulée.

ressemblance nette avec la microflore cellulolytique d'enrichissement décrite par Sijpenstein (1948 [3]), à partir du rumen (fig. 2).

Un deuxième passage sur ce milieu présente des caractères ana-

logues, mais le délai de cellulolyse s'est allongé (trois semaines) ; le milieu de culture est alors modifié ; après de multiples essais négatifs, la formule suivante, inspirée de Sijpenstein, a été retenue : solution saline standard de Winogradsky, 50 ml ; phosphate biammonique, 0,4 g ; extrait de terre, 100 ml ; eau distillée, 850 ml : cellulose broyée ou feuille de papier filtre ; au moment de l'ensemencement on ajoute 1 p. 1 000 d'acide ascorbique, puis on désaère et scelle sous vide ; sur ce milieu la suite des passages a été possible. L'examen microscopique

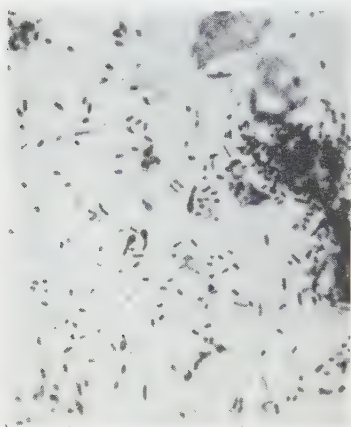


FIG. 3. — Microflore bactérienne cellulolytique. Envahissement par bactéries sporulées.

des lames montre les mêmes espèces morphologiques, avec tendance, surtout en présence de feuille de papier filtre, à l'envahissement par des bactéries sporulées (fig. 3). Nous nous trouvons donc en présence d'un complexe bactérien instable, avec les mêmes caractères morphologiques et évolutifs que ceux observés par Hungate et par Sijpenstein pour le complexe bactérien du rumen et dans lequel ils avaient cru pouvoir dissocier les genres *Ruminobacter* et *Ruminococcus*, déniaient tout rôle aux bactéries sporulées. Tous nos essais d'isolement ont été infructueux : les colonies uniques prélevées ne régénèrent que des bactéries sporulées clostridiennes et plectridiennes.

Le résultat capital de cette étude est donc que la digestion bactérienne de la cellulose, chez cette espèce de termite, pose exactement les mêmes problèmes que chez les ruminants ; il ne saurait être question de les discuter ici (Pochon, 1953 [4]), mais seulement de souligner le très remarquable phénomène de convergence physiologique chez des êtres vivants pour lesquels la cellulose représente la ration alimentaire de base et qui sont dépourvus de cellulase : une symbiose bactérienne complexe (associée ou non à des protozoaires), en équilibre instable dès que les microorganismes sont sortis du milieu intestinal hôte.

Un dernier point reste à préciser : quel est le métabolisme biochimique de l'association bactérienne ? En d'autres termes, sous quelle forme énergétique la cellulose est-elle absorbée par l'hôte ? Ces problèmes ont été très longuement étudiés et comparés chez les termites et les ruminants (Hungate, 1946 [5]).

Dans le cas de nos cultures cellulolytiques, l'analyse chromatographique sur papier a montré l'absence d'acides organiques fixes (en particulier lactique et succinique) et la présence d'acides volatils, essentiellement acétique et butyrique ; de cette constatation on ne peut d'ailleurs inférer de façon certaine ce qui se passe dans le tube digestif : les équilibres biochimiques sont aussi instables que les équi-



libres microbiens. Bien que l'absorption et l'utilisation de ces acides par les termites soient encore controversées, il semble bien qu'il faille s'orienter vers un mécanisme de nutrition ici encore très voisin de celui qui est maintenant universellement admis pour les ruminants.

### SUMMARY

STUDIES ON THE DIGESTION OF CELLULOSE BY TERMITES  
(*Sphaerotermes sphaerotherax*).

The morphology, physiology and evolution of the cellulolytic intestinal flora in the species studied show marked similitudes with that present in the rumen of cattle.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRASSÉ (P.-P.) et NOIROT (C.). *Ann. Sci. nat. zool.*, 1948, sér. **41**, 150.
- [2] POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55**, 676 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 1538 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 870 ; **126**, 854.
- [3] SHPENSTEIN (K.). *Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle*. Thèse, Leyde, 1948.
- [4] POCHON (J.). *Rev. Ferm. et Ind. alim.*, 1953, **8**, nos 1 et 2.
- [5] HUNGATE (R. E.). *J. Elisha Mitchel Sci.*, 1946, **67**, 9.

---

## ACTION DE LA TRUFFE (*TUBER MELANOSPORUM*) SUR LA MICROFLORE TELLURIQUE

par M. A. CHALVIGNAC, C. TYSET et J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol,  
et Laboratoire de Biologie, section technique de l'Armée)

Innombrables sont les travaux consacrés à l'action antibiotique ou plus simplement inhibitrice de champignons vis-à-vis d'autres micro-organismes du sol ou même de végétaux (sans que cela implique qu'ils soient pathogènes).

Nous étudions ici le cas très particulier de la truffe (*Tuber melanosporum*) ; particulier par son habitat tout d'abord, car, si elle peut être trouvée sous genévrier (*Juniperus*), églantier (*Rosa avensis*), pin (*Pinus*), hui (Buzus), noisetier (*Corylus*), vigne (*Vitis*), le chêne, surtout le chêne pédonculé (*Quercus pedunculata*), représente son site d'élection ; particulier aussi, car elle détermine parfois une inhibition

quasi totale, dans un périmètre bien défini, de toute végétation spontanée.

Le but précis de ce travail est de rechercher les incidences éventuelles de ces phénomènes sur la microflore du sol.

Les prélèvements ont été faits dans le Sud-Ouest de la France, région du Quercy (Castelnau Montratier Lot), d'une part sous *Q. pedunculata*, truffier, en zone où toute végétation spontanée est inhibée, d'autre part à 5 m de la périphérie de cette zone (témoin). La délimitation de la zone d'inhibition est très aisée du fait de l'absence totale de toutes les espèces végétales croissant spontanément à proximité parmi lesquelles ont été relevées : *Fetuca ovina*, *Lavandula vulgaris*, *Taraxacum dens leonis*, *Echinum vulgare*, *Tussilago farfara*, *Hieracium pilosella*, *Seriola aenensis*, *Campanula rotundifolia* (noter la polyvalence de l'inhibition végétale).

Il s'agit d'un sol dont la composition minérale est la suivante :  $\text{SiO}_2$ , 76 à 78 p. 100 ;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 11 à 12 p. 100 ;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 7 à 8 p. 100 ;  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , 1,8 p. 100 (noter la richesse en fer, ce sol a d'ailleurs une teinte rouge accentuée). L'analyse organique a été réalisée dans les deux zones :

ZONE TRUFFIÈRE		ZONE TÉMOIN	
Carbone organique..	0,43 %	Carbone organique..	0,7 %
Azote total.....	0,1 %	Azote total.....	0,13 %
Matières humiques..	0,17 ‰	Matières humiques..	0,23 ‰

Le pH est au voisinage de la neutralité (6,8 en zone truffière ; 6,5 dans le témoin).

Toutes les analyses chimiques et biologiques ont porté sur des prélèvements effectués à 10 cm de profondeur.

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE. — La microflore totale est dix fois plus abondante dans la zone témoin (80 millions/g terre) que dans la zone truffière (technique en milieu liquide, Chalhignac [4]).

Les principaux groupements microbiens du cycle de l'azote et du carbone ont été testés (techniques Pochon et coll. [2]).

Fixateurs d'azote aérobies (*Azotobacter*) : 80/g en zone truffière, 1 100/g en zone témoin.

Fixateurs d'azote anaérobies (*Clostridium*) : 4 500/g en zone truffière, 11 000/g en zone témoin.

Ammonificateurs (voir les courbes fig. 1) : ils sont un peu plus actifs en zone témoin.

Protéolytiques (voir les courbes fig. 1) : ils sont beaucoup plus actifs en zone témoin.

Nitrificateurs : différences minimales entre les deux zones, cependant en faveur du témoin ; les dilutions limites de nitrification se situent vers  $10^{-3}$  ; de nitratisation, vers  $10^{-4}$ .

Dénitrificateurs (voir les courbes fig. 1) : ils sont plus actifs en zone témoin.

Amylolytiques (voir les courbes fig. 1) ; activité légèrement supérieure dans la zone témoin.

Cellulolytiques (technique de Barjac [3]) : en zone témoin les aérobies sont dix fois plus nombreux, les anaérobies mésophiles cent fois plus (de l'ordre 110 000/g).

CONCLUSION. — On note donc, dans l'ensemble, une diminution nette de l'activité biologique du sol dans la zone truffière par rapport au témoin ; cette diminution porte sur la microflore totale et aussi

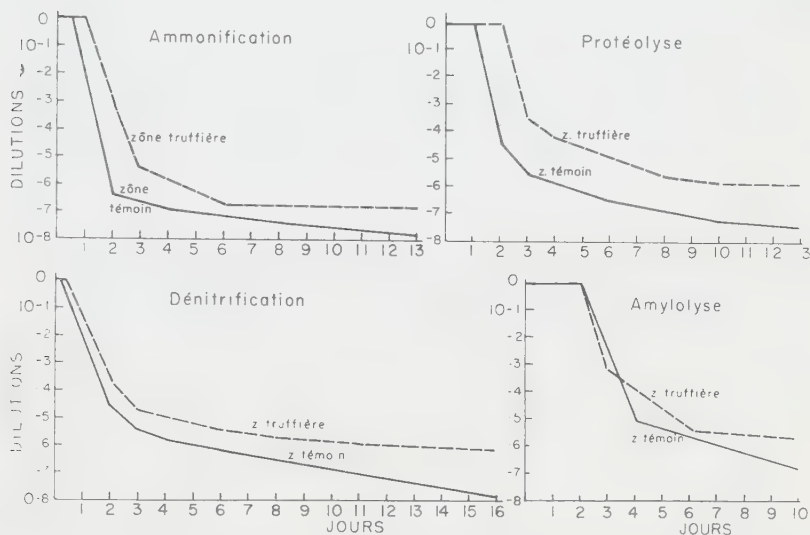


FIG. 1. — Courbes d'ammonification, protéolyse, dénitrification, amylolyse.

sur presque tous les groupements microbiens physiologiques des cycles de l'azote et du carbone.

Dans l'état actuel du problème, deux interprétations peuvent être envisagées :

a) Le champignon truffier a une action inhibitrice (antibiotique?) sur la microflore du sol, de même type que celle qu'il manifeste sur la végétation spontanée ;

b) La diminution de la microflore tellurique en zone truffière est seulement en rapport avec l'absence d'effet rhizosphère, puisque cette zone est totalement dépourvue de végétation.

### SUMMARY

ACTION OF THE TRUFFLE (*Tuber melanosporum*) ON TELLURIC MICROFLORA.

The biological activity is significantly decreased in soils where truffles grow. The total microflora and almost all physiological microbial groups responsible for nitrogen and carbon cycles are implied in this decrease.

Two explanations can be proposed :

a) The truffle has an inhibitory (antibiotic<sup>3</sup>) activity on the soil microflora (activity of the same type as the one it possesses on natural vegetation) ;

b) The decrease of the telluric microflora in truffle zones is only due to the absence of rhizosphere effect, since these zones are totally deprived of vegetation.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHALVIGNAC (M.-A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 602.  
[2] POCHON (J.) et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson, édit., Paris, 1954.  
[3] BARJAC (H. DE). *Pédologie* (Gand), 1957. *Symposium de techniques*, p. 166.

### DÉGAGEMENT D'AMMONIAC PAR LA MICROFLORE DE CERTAINES RHIZOSPHERES EN MILIEU LIQUIDE

par N. BALICKA, H. DE BARJAC et J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol).

Il existe diverses techniques de mesure du pouvoir ammonifiant, basées sur le dégagement de  $\text{NH}_3$  à partir de substances protéiques, par la microflore du sol. Cette mesure peut se faire en terre (Pochon et Tchan [1] ou en milieu liquide (de Barjac et Pochon [2]. Différents substrats peuvent être employés en terre (urée, poudre de sang, farine de légumineuses), comme en milieu liquide (tyrosine, asparagine). Suivant la nature du substrat employé, l'amplitude et l'allure du dégagement de  $\text{NH}_3$  varient.

Il nous a paru intéressant de comparer ici le dégagement de  $\text{NH}_3$  par diverses microflores en présence soit de tyrosine, soit d'asparagine en milieu liquide. Le but était de voir si l'évolution général du phénomène était fondamentalement identique ou, au contraire, différente. Les microflores testées sont calquées sur celles analysées lors de nos expériences antérieures, publiées par N. Balicka [3]. Elles correspondent respectivement à la rhizosphère proche du seigle, à la rhizosphère proche de la vesce, à la rhizosphère proche de seigle + vesce en culture mixte, enfin au témoin sans culture.

TECHNIQUES. — Quatre séries de pots ont été mis en culture, à raison de trois répétitions par série :

- 1° Pots témoins, sans plantes ;
- 2° Pots avec seigle ;
- 3° Pots avec vesce ;
- 4° Pots avec seigle + vesce.

Chaque pot est stérilisé avec 500 g de sable humidifié à l'aide de 80 ml d'extrait de terre + 150 ml de solution saline suivante :  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ , 0,4 g ;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,25 g ;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,16 g ;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 0,09 g ;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,08 g ;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 1 goutte ; solution d'oligo-éléments, 1 ml ; eau distillée, 1 000 ml. Avant stérilisation, on enfonce dans chaque pot, à l'opposé, deux tubes de verre bouchés au coton, qui serviront à ajouter stérilement telle ou telle solution.

Après stérilisation, chaque pot reçoit son inoculum microbien sous forme de 5 g de sol mis en suspension dans 10 ml d'eau stérile. L'inoculation se pratique par l'intermédiaire d'un des tubes de verre précités. Le sol choisi est une terre fertile de jardin, en bon état, afin d'avoir une micro-flore suffisamment représentative.

Trois pots sont laissés à nu. Trois sont ensemencés par des graines de seigle, trois par des graines de vesce et trois par des graines de seigle

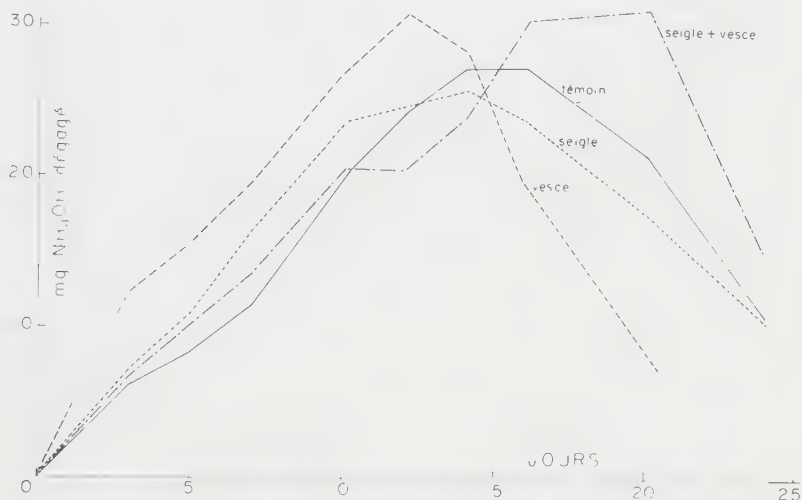


FIG. 1. — Ammonification sur tyrosine.

+ graines de vesce. Toutes les graines sont, au préalable, stérilisées en surface par immersion dans  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  à 1 p. 1 000 suivie de lavages à l'eau distillée stérile. Après pré-germination à l'étuve à 28° C sur rondelles de papier filtre humidifiées stériles, en boîtes de Petri, ces graines sont disposées dans les pots.

Après sept semaines de culture, poursuivie en maintenant l'humidité à poids constant, des prélèvements sont effectués dans tous les pots des quatre séries. Chaque série est ensuite ramenée à 40 g d'échantillon moyen, ces 40 g correspondant soit au sable nu (dans la série témoin), soit (dans les autres séries) à la rhizosphère proche des cultures, c'est-à-dire racines + sable adhérent.

Les quatre séries de prélèvements moyens sont, alors, ensemencées dans un milieu liquide à substrat ammonifiable. Dans un cas, on emploie, comme milieu, la formule suivante : solution de Winogradsky, 50 ml ;



tyrosine, 0,5 g ; eau, 950 ml. Dans l'autre cas, on emploie : solution de Winogradsky, 50 ml ; asparagine, 0,2 g ; eau, 950 ml. Ces deux milieux sont stérilisés, le premier par filtration sur bougie, le second à l'autoclave.

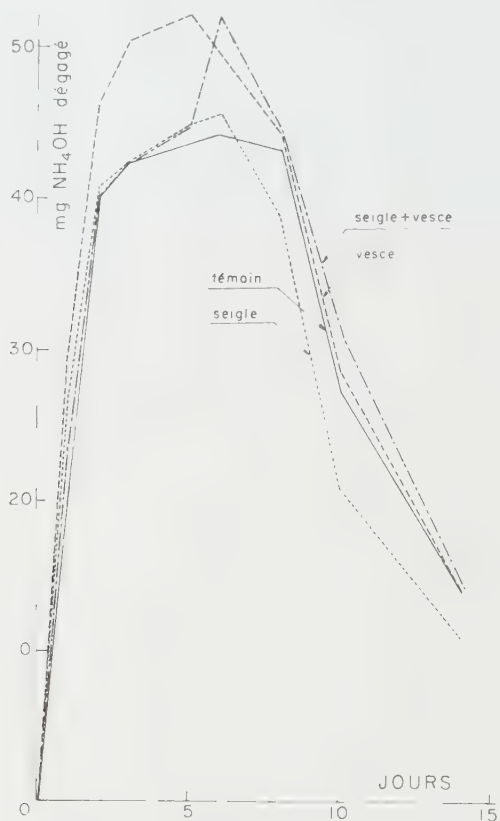


FIG. 2. — Ammonification sur asparagine.

On ensemence chacun d'eux, à raison de 500 ml en fioles, par 20 g de prélèvement. Incubation à 28° C.

Chaque jour, on dose l'ammoniac dégagé par la technique de Drouineau [4].

RÉSULTATS. — Les figures 1 et 2 groupent les résultats obtenus avec les différentes microflores, d'une part sur la tyrosine, d'autre part sur l'asparagine. Les courbes permettent de constater que :

1° Dans les deux cas, le dégagement de  $\text{NH}_3$  est progressif, la quantité de  $\text{NH}_3$  libéré augmentant à partir du premier jour d'incubation pour atteindre son maximum entre trois et six jours dans le cas de l'asparagine, entre dix et douze jours dans le cas de la tyrosine.

Après cet apex, la quantité de  $\text{NH}_3$  trouvé diminue. L'explication en peut résider soit dans la réutilisation de l'ammoniac par la microflore en expérience, soit dans l'oxydation microbiologique de cet ammoniac en nitrites ou en nitrates, l'un n'excluant d'ailleurs pas l'autre. Une preuve en faveur de la seconde hypothèse est apportée par la caractérisation des nitrites et des nitrates qui a été positive en milieu asparagine, après les délais suivants :

	NITRITES	NITRATES
	—	
Série témoin .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série seigle .....	+ au 5 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série vesce .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour
Série seigle + vesce .....	+ au 6 <sup>e</sup> jour	+ au 8 <sup>e</sup> jour

Ceci concorde avec les observations de Fisher [5] et de Chavignac [6].

2° Le dégagement de  $\text{NH}_3$ , en milieu asparagine, est plus rapide et plus élevé qu'en milieu tyrosine. Mais il faut souligner que, malgré ces différences, le classement des microflores, d'après leur activité ammonifiante, suit exactement le même schéma, qu'il s'agisse de la tyrosine ou de l'asparagine. En ordre croissant d'activité, au début, nous avons toujours : témoin, seigle + vesce, seigle, vesce. La différence est encore plus sensible en présence de tyrosine.

3° Le maximum de pouvoir ammonifiant appartient au cas de la microflore rhizosphérique de la vesce, ce qui confirme les résultats de nos expériences antérieures [3].

4° La courbe de dosage, donnée par la microflore rhizosphérique mixte seigle + vesce, apparaît moins régulière que les autres. Au début, elle suit la progression des courbes du témoin sans culture et de la culture seigle. Ensuite, dans les deux cas, elle aligne son maximum avec celui de la culture vesce.

Il semble que cela indique que dans la culture mixte, seigle + vesce, coexistent deux types de microflore qui atteignent successivement leur maximum, du point de vue pouvoir ammonifiant.

## SUMMARY

### RELEASE OF $\text{NH}_3$ BY THE MICROFLORA OF CERTAIN RHIZOSPHERES IN LIQUID MEDIUM.

A comparison of  $\text{NH}_3$  release by various microflorae in presence of tyrosin or asparagin in liquid medium.

Four types of microflora are studied : the first one (control) is the microflora of a garden soil ; the second one, that of a rye-rhizosphere ; the third one, that of a vesce-rhizosphere ; the fourth one, that of a mixed rye and vesce-rhizosphere.

The classification of the microflorae according to their ammonifying capacity is the same with the two substrates (tyrosin or asparagin). The nature of this substrate influences the amount of  $\text{NH}_3$  released and the rate of the process.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 696.
- [2] BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **86**, 82.
- [3] BALICKA (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 480.
- [4] DROUINEAU (G.). *Ann. Agr.*, 1947, **2**.
- [5] FISHER (T.), FISHER (E.) et APPLEMAN (H. D.). *J. gen. Microb.*, 1956, **54**, 238.
- [6] CHALVIGNAC (M. A.) (communication orale).

## LE FACTEUR SÉRIQUE Gm<sup>a</sup> DANS LE SÉRUM D'ANIMAUX DE DIFFÉRENTES ESPÈCES

par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK.

(Institut Pasteur,  
Centre d'Etudes des Groupes Sanguins des Animaux)

Le caractère de spécificité antigénique des protéines sériques est généralement lié à l'espèce.

Peu d'entre elles varient à l'intérieur de l'espèce et on ne connaît encore à présent que deux systèmes de groupes sériques chez l'homme :

1° Le système « haptoglobine » dans les globulines  $\alpha_2$  (Smithies et Walker, 1955) par l'électrophorèse en gel d'amidon ;

2° Le système Gm<sup>a</sup> dans les globulines  $\gamma$  (Grubb et Laurell, 1956 [2, 3]) par une technique sérologique.

Foz et coll. (1954), puis Waller et Vaughan (1956), ont observé que certains sérums de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive agglutinent les globules rouges humains ORh-positifs sensibilisés avec un sérum anti-Rh (anti-D) incomplet.

Heller et coll. (1954), étudiant différents sérums humains et animaux pour intensifier la réaction dite de Waaler-Rose, ont observé que certains sérums humains inhibent partiellement cette hémagglutination.

Grubb et Laurell [3] ont constaté que la globuline  $\gamma$  humaine et le sérum d'environ 60 p. 100 de la population suédoise sont capables d'inhiber la réaction d'agglutination de globules rouges ORh-positifs (sensibilisés à l'aide d'anti-Rh sélectionné) par certains sérums de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive. Ils ont en outre observé que 95 p. 100 des Esquimaux sont Gm (a+).

En France, Moulic et coll. [5] ont trouvé 54,3 p. 100 de sujets Gm (a+) parmi les habitants du département d'Indre-et-Loire. Avec Jacqueline et Eyquem [7] nous avons trouvé 57,3 p. 100 chez les Parisiens, tandis que Hurel et Ropartz [4] en signalent 51,7 p. 100 en Seine-Maritime.

Le facteur sérique Gm<sup>a</sup> (dénomination introduite par Grubb) qui se trouve parmi les globulines  $\gamma$  est responsable de cette inhibition. Il est héréditaire et est probablement déterminé par un couple de gènes alléomorphes Gm<sup>a</sup> et Gm.

Nous avons recherché l'existence du facteur sérique Gm<sup>a</sup> dans le sérum d'animaux de différentes espèces. Les hétéro-agglutinines anti-homme existant dans le sérum des animaux, à un titre plus ou moins élevé, peuvent agglutiner les globules rouges humains ORh-positifs sensibilisés. Les épreuves d'inhibition dans la recherche du Gm<sup>a</sup> ont été réalisées après absorption des hétéro-anticorps comme suit : le sérum à examiner, après un chauffage à 56° C pendant trente minutes, est mis en contact pendant deux heures, à la température du laboratoire, avec un volume égal de culot de globules rouges humains de n'importe quel groupe (lavés préalablement quatre fois avec de l'eau physiologique). On contrôle l'absorption complète des hétéro-hémagglutinines dans la fraction du sérum recueillie après centrifugation. Si l'absorption n'est pas complète, on répète l'opération (comme ci-dessus). La technique de la recherche du Gm<sup>a</sup> a été décrite antérieurement [7].

L'étude des globulines  $\gamma$  du cheval, bœuf, mouton et porc a montré qu'elles ne peuvent inhiber l'agglutination des globules rouges humains sensibilisés, provoquée par un sérum de polyarthrite chronique évolutive, c'est-à-dire qu'elles ne contiennent pas le facteur sérique Gm<sup>a</sup>.

Nous avons examiné le sérum de 25 chevaux, 23 bovins, 11 ânes, 16 porcs, 20 moutons, 20 chiens, 2 chats, 12 poules, 18 lapins, 14 cobayes, 12 rats, 12 souris et 44 singes [17 cynocéphales, 1 *Macacus rhesus* et 26 chimpanzés (1)].

Le sérum (après l'absorption des hétéro-anticorps) a été examiné : non dilué, dilué à 1/5 et à 1/10. Nous avons constaté qu'à l'exception de celui des 26 chimpanzés, aucun des sérums examinés ne contient le facteur Gm<sup>a</sup>.

Le sérum de tous les chimpanzés étudiés s'est révélé comme possédant le caractère des sérums humains Gm (a+). La concentration du Gm<sup>a</sup> dans le sérum de ces chimpanzés est un peu plus faible que chez l'homme. En effet, ce sérum n'est capable d'inhiber la réaction d'hémagglutination que lorsqu'il est dilué à 1/5, tandis que le sérum humain l'est encore dans une dilution à 1/10, 1/20 et plus (tableau I).

Comme chez l'homme, la présence du facteur Gm<sup>a</sup> est constante chez les chimpanzés adultes. Nous avons examiné à plusieurs reprises quelques-uns de ces animaux, et obtenu chaque fois les mêmes résultats.

On peut supposer que l'impossibilité de déceler le facteur Gm<sup>a</sup> chez la plupart des animaux est attribuable à la fixation des globulines  $\gamma$ , qui le déterminent, lors de l'absorption des hétéro-anticorps.

Pour vérifier cette supposition, nous avons absorbé les hétéro-hémag-

(1) Les échantillons de sang des chimpanzés ont été adressés au Laboratoire d'Hématologie par l'Institut Pasteur de Kindia (Directeur : M. Lefrou) grâce à l'intervention de M. Vancel. L'étude de leurs antigènes et groupes sanguins sera publiée ultérieurement.

glutinines anti-mouton du sérum de deux sujets Gm (a+) et avons déterminé le taux de Gm<sup>a</sup> existant dans le sérum avant et après l'absorption. Nous n'avons pas trouvé de différence notable.

TABLEAU I.

DILUTION du SÉRUM	1	5	10	20	40
Homme	—	—	—	—	++
Chimpanzé	—	—	++	+++	+++
Cynocéphale	+++	+++	+++	+++	+++

— inhibition (présence du facteur Gm<sup>a</sup>); + hémagglutination (absence du facteur Gm<sup>a</sup>).

La présence du facteur Gm<sup>a</sup> dans le sérum des chimpanzés apporte une preuve de plus de l'étroite parenté existant entre les protéines sériques de ces derniers et celles de l'homme.

RÉSUMÉ. — La recherche du facteur sérique Gm<sup>a</sup> dans le sérum des chevaux, bovins, ânes, porcs, moutons, chiens, chats, poules, lapins, cobayes, rats, souris et singes (cynocéphales et chimpanzés) n'a révélé sa présence que dans le sérum des chimpanzés étudiés.

## SUMMARY

THE FACTOR Gm<sup>a</sup> IN THE SERUM OF VARIOUS ANIMAL SPECIES.

Sera of bovines, horses, donkeys, pigs, sheep, dogs, cats, chicken, guinea-pigs, rats, mice, monkeys (cynocephalus and chimpanzees) have been examined for the presence of the factor Gm<sup>a</sup>. This factor was present in chimpanzees serum only.

## BIBLIOGRAPHIE

- [4] EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.). *Communication n° 37, VII<sup>e</sup> Congrès Soc. Int. Transf. sang.*, Rome, 1958. Karger, édit. (*sous presse*).
- [2] GRUBB (R.). *Acta pathol. microb. scand.*, 1956, **39**, 195.
- [3] GRUBB (R.) et LAURELL (A. B.). *Acta. pathol. microb. scand.*, 1956, **39**, 390.
- [4] HUREL (R.) et ROPARTZ (C.). *Rouen méd.*, 1957, **31**, 10.
- [5] MOULLEC (J.), KHERUMIAN (R.), SUTTON (E.) et ESPAGNON (P.). *Rev. Hématol.*, 1956, **11**, 512.
- [6] PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *Communication n° 247, VII<sup>e</sup> Congrès Soc. Int. Transf. sang.*, Rome, 1958. Karger, édit. (*sous presse*).
- [7] PODLIACHOUK (L.), JACQUELINE (F.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 590.



## RECHERCHES SUR L'IMMUNISATION DE LA BREBIS CONTRE LA MAMMITE STAPHYLOCOCCIQUE

par J. PILLET O. GIRARD, H. DUTHEIL et B. ORTA (\*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Nous avons recherché au cours de différentes séries d'expériences quelle était la valeur préventive d'une vaccination anti-staphylococcique (vaccin mixte : anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  et corps microbiens sélectionnés) à l'égard de la mammites expérimentale de la brebis.

Dans une première série d'essais, nous avons utilisé la voie intramusculaire en employant des doses importantes de vaccin en injections répétées (12 injections en moyenne, doses croissantes de 1 à 20 cm<sup>3</sup>).

Les résultats immunologiques de ces expériences ont été très satisfaisants (augmentation remarquable des antitoxines  $\alpha$  et  $\beta$  et élévation nette mais moins marquée des agglutinines), mais la résistance des animaux vaccinés à l'infection provoquée s'est avérée trop irrégulière pour que ce mode d'immunisation puisse être considéré comme satisfaisant, tout au moins vis-à-vis de l'infection expérimentale.

Il y a lieu de noter en effet, à ce propos, que l'infection expérimentale que nous provoquons, et dont la technique sera décrite plus loin, est manifestement plus brutale et plus massive que celle qui peut se produire dans les conditions naturelles.

C'est pourquoi, bien que la vaccination par voie intramusculaire ne semble pas suffisante pour protéger régulièrement l'animal contre la mammites expérimentale, il conviendra de rechercher si ce mode de vaccination ne permet cependant pas à la brebis de lutter avec succès contre l'infection très vraisemblablement légère qui est à l'origine de la mammites spontanée.

Quoi qu'il en soit, à la suite de ces résultats et d'observations fortuites (animaux résistants à l'infection expérimentale après injection d'une première dose infectante insuffisante), nous avons tenté, d'autre part, l'immunisation de la brebis par voie locale en injectant le vaccin au niveau du tissu mammaire par l'intermédiaire du canal du trayon.

Ce sont les résultats particulièrement encourageants d'expériences faites en suivant cette technique qui font l'objet de cette note.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — *Vaccin*. — Emulsion dans un mélange d'anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  contenant au centimètre cube 10 U. I. de chacune des anatoxines, de corps microbiens tués provenant des souches de staphylocoques types I, III, 8 et de trois souches de staphylocoques pathogènes isolées

(\*) Cette note avait été déposée sous pli cacheté à la séance de la Société Française de Microbiologie du 5 janvier 1956, pli ouvert à la séance du 8 janvier 1959.

sur la brebis et productrices des deux toxines  $\alpha$  et  $\beta$  (souches nos 90, 131, 684) [4, 2].

Afin de prévenir tout accident infectieux immédiat, provoqué par le traumatisme vaccinal, le vaccin est additionné au moment de l'emploi de 100 000 U. de pénicilline par centimètre cube de vaccin.

*Brebis.* — Les brebis ont été vaccinées et testées en pleine période de lactation, soit un à deux mois après la mise bas (1).

*Vaccination.* — a) *Méthode.* Injection par le canal du trayon à l'aide d'une sonde de 3 cm; celle-ci est introduite complètement dans le canal et l'injection se fait au contact du tissu mammaire.

b) *Nombre et intervalles des injections.* Les injections sont faites dans chacun des deux trayons à quatre jours d'intervalle, la série étant de trois à quatre injections successives.

c) *Doses de vaccin injecté.* Nous avons injecté 1 cm<sup>3</sup> de vaccin dans chaque trayon, soit 2 cm<sup>3</sup> au total pour chacune des vaccinations. La série totale nécessite donc 6 à 8 cm<sup>3</sup> de vaccin par animal.

*Infection provoquée.* — a) *Méthode.* Injection dans chaque trayon par la même technique que celle utilisée lors de la vaccination, de 1 cm<sup>3</sup> d'une émulsion d'une culture de 18 heures de staphylocoques  $\alpha$ ,  $\beta$  toxigènes provenant d'une souche isolée sur la brebis au cours d'une mammite spontanée (no 90). L'émulsion est préparée de la façon suivante: les staphylocoques provenant d'une culture en stries serrées sur gélose (tube à essai de 17 mm de diamètre) sont émulsionnés dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

b) *Date.* L'infection expérimentale a été provoquée suivant les expériences, une à trois semaines après la fin des vaccinations.

*RÉSULTATS.* — Les résultats sont résumés dans le tableau ci-joint, dans lequel nous avons adopté les abréviations suivantes: « Mammite + » qui correspond à une mammite caractérisée allant de l'engorgement massif de la mamelle avec noyaux indurés, à l'escarre avec sphacèle d'une fraction plus ou moins importante de la mamelle. Ces lésions s'accompagnent très généralement d'arrêt total de la lactation. « Mammite  $\pm$  » qui correspond à une légère augmentation de volume de la mamelle avec induration modérée et érythème. Cette forme qui s'accompagne de petits troubles de la lactation évolue en général rapidement et se termine en cinq à six jours sans laisser de séquelles.

L'examen du tableau montre clairement que l'introduction de vaccin mixte spécifique par voie locale a pour effet de rendre la mamelle réfractaire à l'infection staphylococcique expérimentale, tout au moins lorsque celle-ci est provoquée une à trois semaines après la fin de la vaccination.

Nous n'avons pu, en effet, étant donné le petit nombre d'animaux mis à notre disposition, expérimenter jusqu'à maintenant que selon ce seul protocole.

Différents points seront à préciser ultérieurement parmi lesquels il faut citer:

- 1° La détermination de la durée de cet état réfractaire;
- 2° Le mécanisme de cette action protectrice; la première hypothèse

(1) Les brebis utilisées dans ces recherches ont été fournies par la Société des Caves de Roquefort, que nous tenons à remercier ici. C'est en effet grâce au soutien matériel (animaux) et à l'esprit d'étroite collaboration de la Direction de la Société des Caves que ce travail a pu être effectué.

venant à l'esprit étant celle de l'établissement d'un état d'immunisation local.

Notons pour terminer que l'adjonction de pénicilline au vaccin nous a été imposée par la constatation de deux mammites survenues au cours des expériences 3 et 4, ces mammites étant très probablement provoquées par le transport au niveau du tissu mammaire au cours de la vaccination, de germes végétant habituellement au niveau du trayon. L'expérience 5 dans laquelle nous avons utilisé le vaccin additionné de pénicilline s'est déroulée sans aucun accident, ce qui confirme dans une certaine mesure ce point de vue.

Expérience n°	TÉMOINS				VACCINÉS			
	Nombre d'animaux	Mammites			Nombre d'animaux	Mammites		
		+	±	0		+	±	0
I	5	4	0	I	6	0	2	4
2	2	2	0	0	4	0	0	4
3	2	2	0	0	2	0	0	2
4	2	2	0	0	2	0	0	2
5	4	4	0	0	4	0	I	3
Total	15	14	0	I	18	0	3	15

Différentes expériences réalisées depuis sur une échelle plus étendue nous ont, par ailleurs, permis de constater que, sous couvert de pénicilline, la vaccination par le canal du trayon était parfaitement réalisable sur le plan pratique et ne présentait pas de danger pour l'animal.

**RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS** — Nous avons constaté au cours d'expériences sur la prévention de la mammite staphylococcique expérimentale de la brebis qu'une vaccination locale pratiquée par l'intermédiaire du canal du trayon à l'aide d'un vaccin mixte (anatoxines  $\alpha$  et  $\beta$  + corps microbiens sélectionnés) permettait de protéger les brebis d'une façon pratiquement constante lorsque l'infection expérimentale était provoquée une à trois semaines après la fin des vaccinations.

Certains points complémentaires seront à étudier ultérieurement : durée de la protection, mécanisme de celle-ci (très vraisemblablement processus d'immunisation local), mais il semble que dès maintenant ces résultats, en dehors de leur incidence pratique, devraient permettre de préciser dans une certaine mesure les rapports hôte-microbes dans le cas des staphylococcies.

## SUMMARY

STUDIES ON IMMUNIZATION OF SHEEP AGAINST EXPERIMENTAL  
STAPHYLOCOCCAL MASTITIS.

A local immunization carried out in the teat duct with a mixed vaccine ( $\alpha$  and  $\beta$  toxoids + selected bacterial cells) protects sheep against a challenge infection realized one to three weeks after the immunization.

Certain problems need further study : duration of protection, mechanism of this protection (probable a local immunization process).

Besides their practical significance, the findings allow to study host-bacteria relationships in the case of staphylococcal infections.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Bull. Acad. vétér.*, 1950, n° 7, 403.  
[2] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Ibid.*, 1950, n° 7, 409.

**TROIS NOUVEAUX SÉROTYPES**  
**DU GROUPE SALMONELLA ISOLÉS AU CONGO BELGE :**  
**S. INGANDA (6,7 : z10 : 1,5), S. IPEKO (9,12 : c : 1,6)**  
**ET S. BOLOMBO (3,10 : z38 : -)**

par E. VAN OYE, C. LUCASSE, V. HERIN et M<sup>lle</sup> M. BEAUFORT.

(*Institut de Médecine Tropicale « Princesse Astrid », Léopoldville*  
[Directeur : D<sup>r</sup> E. VAN OYE], *Laboratoire médical provincial de Coquilhatville* [Directeur : D<sup>r</sup> C. LUCASSE], *et Service vétérinaire provincial* [Directeur : D<sup>r</sup> méd. vét. V. HÉRIN])

Les trois nouvelles salmonelles qui seront décrites dans cette note ont toutes été isolées au Laboratoire médical de Coquilhatville, chef-lieu de la Province de l'Equateur au Congo belge.

Deux souches de *S. inganda* proviennent de ganglions mésentériques de deux porcs différents, examinés le même jour. *S. ipeko* a été isolée à trois reprises, deux fois par coproculture chez des indigènes (dont un présentait en même temps une infection à *S. uganda*) et une fois par culture d'un ganglion chez un porc. Enfin, *S. bolombo* a été trouvée une première fois chez un porc, par culture d'un ganglion mésentérique, et une seconde fois chez une poule, par culture de moelle osseuse.

Les propriétés biochimiques de ces trois nouveaux sérotypes sont identiques : il y a fermentation, dans les vingt-quatre heures et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. Ne sont pas attaqués en trente jours : l'adonite, l'inosite, le lactose, le saccharose et la salicine.

Les germes produisent de l'hydrogène sulfuré et réduisent les nitrates. Ils ne se développent pas dans le milieu de Braun au KCN. La réaction de Stern est négative chez les trois types.

Il n'y a pas de liquéfaction de la gélatine, ni production d'indole, ni décomposition de l'urée. La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyl est positive.

Les cultures se développent en vingt-quatre heures sur le milieu au citrate de soude de Simmons et acidifient le milieu au D-tartrate de Jordan et Harmon.

Les propriétés biochimiques de ces trois nouveaux types sont ainsi caractéristiques pour les membres du groupe *Salmonella* ; leurs caractères culturels et morphologiques le sont également.

La détermination de la structure antigénique n'a pas présenté de difficultés et a pu se faire sans qu'il ait été nécessaire de recourir à la fabrication de nouveaux sérums ou à des absorptions croisées.

1° L'antigène somatique de *S. inganda* est agglutiné par un sérum anti-O : 6, 7, 8 non-absorbé, ainsi que par un sérum anti-O : 7 absorbé ; il ne l'est pas par un sérum anti-O : 8 pur.

L'antigène de la phase flagellaire-1 est agglutiné au titre par un sérum anti-H :  $z_{10}$  à l'exclusion de tous les autres. L'antigène de la phase flagellaire-2 est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7 ainsi que par un sérum absorbé anti-H : 5.

La structure antigénique de *S. inganda* peut donc être représentée par la formule = 6,7 :  $z_{10}$  : 1,5.

2° L'antigène somatique de *S. ipeko* est agglutiné au titre par les sérums anti-O du groupe sérologique D.

L'antigène flagellaire de la première phase est agglutiné uniquement par un sérum anti-H : c ; celui de la seconde phase est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7, ainsi que par le sérum anti-H : 6 pur.

La formule antigénique de *S. ipeko* est donc : 9,12 : c : 1,6.

3° L'antigène somatique de *S. bolombo* est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-O du groupe sérologique E, et par un sérum anti-O : 10 pur. Cette *Salmonella* appartient donc au sous-groupe sérologique E. 1.

L'antigène flagellaire est agglutiné au titre par un sérum anti-H :  $z_{38}$ . Des essais en tube de Craigie et sur plaque de Gard avec gélose semi-solide additionnée d'un sérum anti-H :  $z_{38}$  ont montré que ce germe est monophasique. Sa structure antigénique est donc : 3,10 :  $z_{38}$  —.

Nous tenons à remercier le professeur F. Kauffmann, Directeur du Centre International des *Salmonellae* à Copenhague, qui a bien voulu contrôler ces trois nouveaux sérotypes.



RÉSUMÉ. — Les auteurs signalent la découverte au Congo belge de trois nouveaux sérotypes du groupe *Salmonella*, notamment : *S. inganda* (6,7 :  $z_{10}$  : 1,5), *S. ipeko* (9,12 :  $c$  : 1,6) et *S. bolombo* (3,10 :  $z_{38}$  : —).

#### SUMMARY

Three new *Salmonella* serotypes isolated in the Belgian Congo are described, namely *S. inganda* (6,7 :  $z_{10}$  : 1,5), *S. ipeko* (9,12 :  $c$  : 1,6) and *S. bolombo* (3,10 :  $z_{38}$  : —).

### UNE NOUVELLE *SALMONELLA* ISOLÉE AU CONGO BELGE : *S. BUKAVU* (1,40 : L, $z_{28}$ : 1,5)

par E. VAN OYE, P. VASSILIADIS, P. JANSSEN et G. VAN LOOY.

(Institut de Médecine tropicale « Princesse Astrid », Léopoldville [Directeur : Dr E. VAN OYE], et Laboratoire médical provincial de Bukavu [Kivu, Congo belge])

La nouvelle *Salmonella* qui sera décrite dans cette note, et qui a reçu le nom de *Salmonella bukavu*, a été isolée par coproculture chez une femme indigène qui souffrait de troubles gastro-intestinaux. L'isolement a été fait au Laboratoire médical de Bukavu, chef-lieu de la province du Kivu au Congo belge.

Le germe possède les caractères culturels et morphologiques usuels d'une *Salmonella* et les propriétés biochimiques suivantes : fermentation, en un jour et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, de l'inosite, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. L'adonite, le lactose, le saccharose et la salicine ne sont pas attaqués en trente jours.

Le germe produit de l'hydrogène sulfuré et réduit les nitrates. La réaction de Stern est positive après deux jours. Il ne se développe pas dans le milieu de Braun au KCN.

La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge méthyl est positive. La gélatine n'est pas liquéfiée, et l'urée n'est pas décomposée. Il n'y a pas de production d'indole.

On observe les résultats suivants dans les milieux contenant des acides organiques : citrate +<sup>1</sup>, mucate +<sup>2</sup>, D-tartrate X, L-tartrate —<sup>14</sup> et I-tartrate —<sup>14</sup>.

Sur lames, la culture est agglutinée par nos sérums anti-O : 40 et et O : 49. Nous avons préparé ce dernier avec une culture de *S. bula-wayo* chez qui Kauffmann et Deom (1957) avaient signalé la présence,

en plus de l'antigène somatique O : 49, du facteur O : 40. Nous avons ainsi été amenés tout d'abord à croire que l'antigène somatique de *S. bukavu* devait être O : 49, étant donné que les germes du groupe sérologique « S » ne possèdent pas cet antigène. P. R. Edwards, que nous tenons à remercier de son obligeance, a attiré l'attention sur ce qui était une erreur (*vide infra*).

Nous avons alors entrepris des recherches plus approfondies et en avons consigné les résultats dans le tableau I. Il ressort de ces données que les antigènes somatiques de *S. bukavu* sont identiques à ceux de *S. johannesburg*, que ces deux sérotypes possèdent, en plus de l'antigène O : 40, un facteur qui n'est pas présent chez *S. bulawayo* et que, d'autre part, cette dernière possède également un facteur qui est absent chez *S. bukavu* et *S. johannesburg*.

TABLEAU I. — L'antigène somatique de *Salmonella bukavu*.

Sérums	Antigènes		
	<i>S. bulawayo</i>	<i>S. johannesburg</i>	<i>S. bukavu</i>
<i>S. bulawayo</i> non-absorbé	3.200	3.200	3.200
absorbé par <i>S. johannesburg</i>	400	-	-
<i>S. bukavu</i>	400	-	-
<i>S. johannesburg</i> non-absorbé	800	3.200	3.200
absorbé par <i>S. bulawayo</i>	-	1.600	1.600
<i>S. bukavu</i>	-	-	-
<i>S. bukavu</i> non-absorbé	3.200	3.200	3.200
absorbé par <i>S. bulawayo</i>	-	400	400
<i>S. johannesburg</i>	-	-	-

Mais l'antigène somatique majeur de ces trois *Salmonellae* est bien O : 40 et il convient dès lors d'écrire la formule antigénique de *S. bulawayo* = 1,40 : z : 1,5 et non pas = (1),49 : z : 1,5. En fait, nous nous rallions ici à l'opinion unanime des D<sup>rs</sup> Edwards, Taylor et Kauffmann (comm. pers.).

L'antigène somatique de *S. bukavu* étant le même que celui de *S. johannesburg*, il s'écrit évidemment : 1,40.

L'antigène flagellaire de la phase-1 est identique à celui de *S. javiana* (=  $l, z_{28}$ ). Ceci ressort de réactions d'agglutination avant et après absorptions croisées des sérums que nous avons préparés à l'aide de l'antigène flagellaire « spécifique » de ces deux sérotypes.

L'antigène de la phase flagellaire-2 est agglutiné par un sérum non-absorbé anti-H : 1, 2, 5, 6, 7 et par le sérum anti-H : 5 pur.

La structure antigénique de *S. bukavu* est donc = 1,40 :  $l, z_{28}$  : 1,5.

Nous tenons à remercier le professeur Kauffmann, Directeur du Centre International des Salmonellae à Copenhague, d'avoir bien voulu contrôler ce nouveau sérotype et nous faire part de ses avis et conseils.

RÉSUMÉ. — Description d'une nouvelle *Salmonella* isolée par coproculture chez une femme indigène du Congo belge : *S. bukavu* = 1,40 : l, z<sub>28</sub> : 1,5.

#### SUMMARY

The description is given of a new *Salmonella* serotype isolated from a native woman of the Belgian Congo : *S. bukavu* = 1,40 : l, z<sub>28</sub> : 1,5.

#### BIBLIOGRAPHIE

KAUFFMANN (F.) et DEOM (J.). *Acta path. microb. scand.*, 1957, 40, 347.

## RECHERCHES SUR L'ANTAGONISME D'UNE PART, ET LE RENFORCEMENT D'ACTIVITÉ D'AUTRE PART DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES COMBINÉS PAR PAIRES

par H. J. OSKAM et M<sup>lle</sup> A. KOELMAN.

(Laboratoire de Bactériologie  
de la Clinique Médicale de l'Université d'Utrecht)  
(Présenté par M. VAN DEINSE).

Le problème de l'interférence des antibiotiques, appliqués en combinaisons, est à l'ordre du jour. Non seulement les résultats changent avec les méthodes d'investigation, mais la discussion sur l'existence de synergie ou d'antagonisme entre deux antibiotiques est rendue difficile par l'imprécision des définitions. Dernièrement, Garrett [2], en passant en revue les différentes possibilités, vient d'augmenter encore l'imbraglio en proposant un nouveau classement des notions.

En 1956, Chabbert [4] a décrit l'antagonisme existant entre l'érythromycine et la spiramycine quant à leur action sur des staphylocoques résistants à l'érythromycine et sensibles à la spiramycine. A la suite de notre description [4] d'une technique permettant d'obtenir le renforcement réciproque d'activité de la combinaison érythromycine-tétracycline, M. Chabbert a bien voulu mettre à notre disposition un certain nombre de ses souches, pour que nous puissions les examiner selon notre technique.

Entre temps, nous avons développé une méthode plus exacte pour déterminer les concentrations équivalentes des diverses antibio-

tiques [5], permettant d'exprimer par un seul nombre le rendement de croissance des bactéries dans une culture. Ce *rendement relatif* est obtenu par addition des pourcentages d'absorption de la lumière par la culture après 2,5, 5, 7,5 et 24 heures d'incubation.

A l'aide de ce rendement relatif, indiqué par  $\Sigma a$ , nous calculons

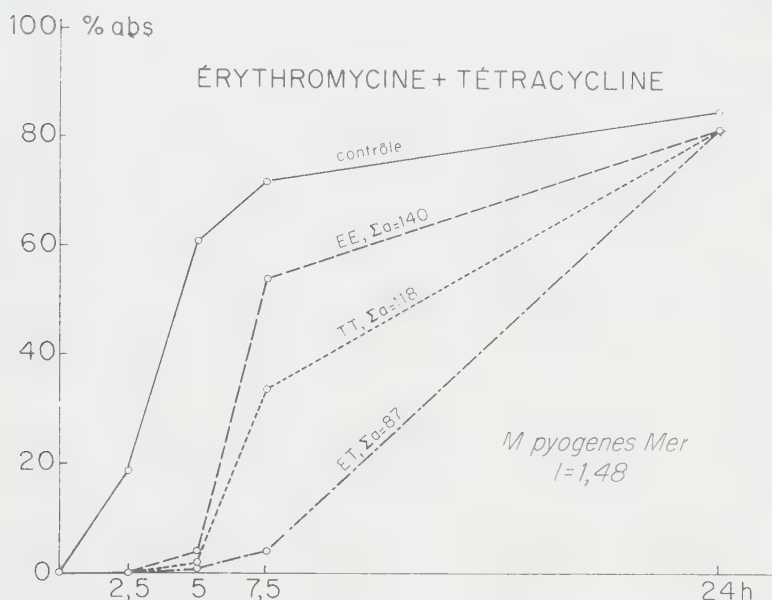


FIG. 1. — Effet de la combinaison érythromycine + tétracycline.  $I = 1,48$ .

l'*indice d'interférence*, indiqué par la lettre  $I$ . Cet indice exprime la relation existant entre le rendement moyen, obtenu en présence de 2 unités retardatrices des antibiotiques isolés, et celui obtenu en présence de la combinaison de 1 unité de chacun d'entre eux. La formule suivante exprime cette relation :

$$I = \frac{\frac{\Sigma a}{2} \frac{XX + YY}{\Sigma a}}{XY}$$

$X$  et  $Y$  représentant les unités retardatrices des substances  $X$  et  $Y$ .

Quand il s'agit d'une simple addition des effets d'antibiotiques combinés, on s'attendra à ce que  $I = 1$  environ, qu'un antagonisme éventuel soit exprimé par  $I < 1$  et un renforcement par  $I > 1$ . Les deux figures illustrent la détermination de  $I$  pour deux combinaisons. Ces figures montrent en outre que l'interférence des antibiotiques ne peut être jugée uniquement d'après la croissance au bout de 24 heures d'incubation. C'est peut-être pour cette raison que Levitt et Hubble [3] et Wiesmann [6] n'ont pu confirmer nos résultats.

Le tableau présente les résultats obtenus par des combinaisons par paires de quatre antibiotiques : tétracycline [T], érythromycine [E], oléandomycine [O] et spiramycine [S] (1). Les chiffres sont aussi simples que surprenants. Ils confirment l'antagonisme ES et le renforcement d'activité dans le cas de ET. Les combinaisons OT et ST

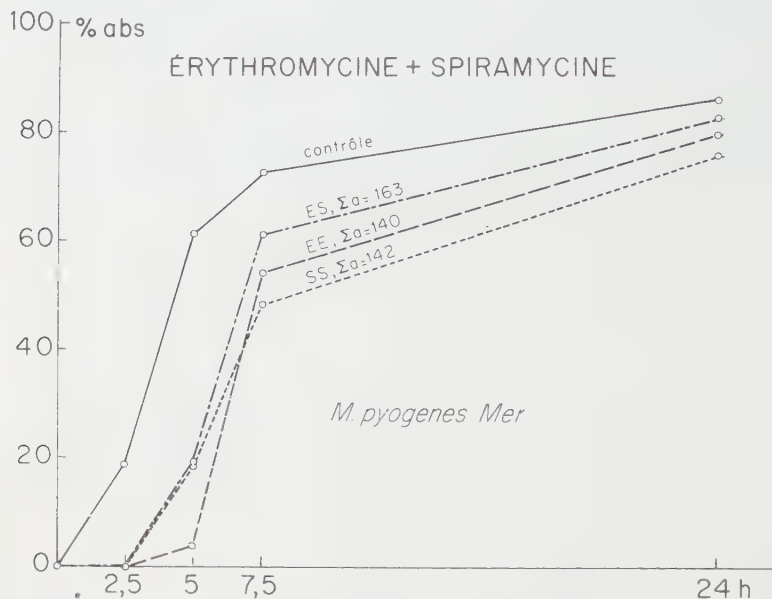


FIG. 2. — Effet de la combinaison érythromycine + spiramycine. I = 0,86.

TABLEAU I. — Indices d'interférence (I) et unités de retardement ( $U_r$ ).

Souches de <i>M. pyogenes</i>	Combinaisons						$U_r$ en $\mu\text{g/ml}$			
	ET	OT	ST	EO	ES	OS	E	O	S	T
Ang (en triple)	1,33 1,23 1,26	1,57 1,65 1,40	1,55 1,53 1,50	0,90 0,78 0,75	0,76 0,71 0,79	0,91 0,97 0,97	0,25	0,45	1,37	23
P 211	1,34		1,22		0,83		2		5	0,03
Car	1,77	1,22	1,65	0,88	0,77	0,95	0,15	0,25	1	20
Mer	1,47	1,47	1,34	0,91	0,86	0,90	1	0,25	1	32
Kopj	1,41	1,30	1,25	0,81	0,85	0,96	0,25	0,25	0,4	25
Nahia	1,46	1,58	1,31	0,85	0,70	0,86	0,28	0,17	1	33
Cagli	1,30	1,18	1,23	1,03	0,91	0,91	0,07	0,25	1,34	27
Thier	1,13	0,98	1,24	0,96	0,95	0,97	0,65	5	5,3	0,06
Z 156	1,20	1,35	1,25	0,86	0,91	0,85	0,16	0,13	0,67	16

(1) La spiramycine nous a été aimablement fournie par Specia, sous le nom de Rovamycine ; l'oléandomycine (Romicil) par Hoffmann-La Roche ; l'érythromycine (Ilotycin) par la Maison Lilly. Nous les remercions de leur bienveillante collaboration.



ont un comportement analogue à celui de la combinaison ET ; celui des combinaisons EO et OS est peut-être analogue à celui de ES, mais cela est moins évident.

Pour les antibiotiques étudiés, l'interférence semble être pratiquement indépendante du degré de sensibilité individuelle des souches utilisées : cela ressort des valeurs des unités retardatrices différentes entre elles ( $U_r$ ).

CONCLUSION. — Nos résultats semblent corroborer l'opinion de Garrett [2], d'après laquelle des combinaisons standard, destinées à la vente au public, peuvent être choisies de telle façon que les avantages dépassent les inconvénients. Cela ne signifie nullement que la détermination de l'antibiogramme soit devenue inutile : elle garde toute sa valeur au contraire, car elle permet de faire un choix judicieux parmi les préparations proposées dans le commerce pharmaceutique.

RÉSUMÉ. — De nouvelles recherches ont confirmé l'existence d'un antagonisme entre érythromycine et spiramycine, et d'un renforcement d'activité entre érythromycine et tétracycline. Cette interférence se révèle indépendante de la sensibilité des souches étudiées.

## SUMMARY

### STUDIES ON ANTAGONISM AND POTENTIATION OF SOME ANTIBIOTICS ASSOCIATED BY PAIRS.

The existence of an antagonism *in vitro* between erythromycin and spiramycin and of potentiation between erythromycin and tetracyclin has been confirmed by a new series of experiments. It seems, that the interference does not depend on the sensitivities of the strains tested.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHABBERT (Y.) et HERVÉ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 787.
  - [2] GARRETT (E. R.). *Antib. Chemoth.*, 1958, **8**, 8.
  - [3] LEVITT (R. O.) et HUBBLE (R. H.). *New Eng. J. Med.*, 1957, **257**, 180.
  - [4] OSKAM (H. J.), KOELMAN (A.) et SCHEE-JANSEN (M. v. d.). *Acta med. scand.*, 1956, **155**, 335.
  - [5] OSKAM (H. J.) et KOELMAN (A.). *Nature*, 1959 (*sous presse*).
  - [6] WIESMANN (E.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1957, **87**, 1045.
-

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIRUS DE COXSACKIE ÉVOLUTION DES LÉSIONS CHEZ LE SOURICEAU

par R. CAMAIN et P. BRES.

(Institut Pasteur de l'A. O. F., Dakar)

Lors de l'isolement de souches de virus de Coxsackie A [4] par inoculation aux souriceaux nouveau-nés, la régularité quasi chronométrique de l'ordre d'apparition des localisations musculaires du virus et de leurs symptômes est un fait remarquable. Il semble que le virus se comporte comme s'il obéissait à un tropisme musculaire singulièrement électif.

Nous avons donc tenté de suivre l'ordre d'apparition des lésions de myosite dans les différents groupes musculaires en pratiquant un examen anatomo-pathologique des souriceaux inoculés par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale et sacrifiés de douze en douze heures après l'inoculation.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — L'inoculation a été effectuée chez des souriceaux âgés de 48 heures. Johnsson [2] rapporte que les symptômes caractéristiques chez les souriceaux apparaissent de trois à six jours après l'inoculation pour les souches A. L'évolution mortelle des paralysies a été beaucoup plus rapide chez nos souriceaux, mais peut-être s'agit-il d'une sensibilité particulière de notre élevage.

La souche de virus inoculée, souche KO (deuxième passage), appartient au groupe A type 6 (1) et a été isolée à Dakar en 1957. L'inoculum est constitué par une suspension dans 2 ml d'eau physiologique d'un cerveau de souriceau servant à l'entretien de la souche. Le souriceau est sacrifié au stade paralytique et le cerveau est conservé à  $-20^{\circ}$ . L'inoculation des souriceaux est faite à la dose de 0,05 ml par voie intrapéritonéale ou 0,01 ml par voie intracérébrale.

**RÉSULTATS.** — *Aspect clinique* : Douze et vingt-quatre heures après l'inoculation, il n'y a rien à signaler qui soit apparent. A la trente-sixième heure, alors qu'il ne se passe rien pour les souriceaux inoculés par voie intracérébrale, les premiers symptômes de paralysie se manifestent pour ceux inoculés par voie intrapéritonéale. Nous avons toujours vu la paralysie débiter de la même façon. Il s'agit d'abord d'une parésie frappant un seul des deux membres postérieurs : celui-ci a tendance à rester en extension et quand le souriceau veut se déplacer, la force segmentaire du membre opposé étant encore normale, il effectue un mouvement giratoire. A la quarante-huitième heure, l'affaissement du train postérieur qui s'ébauchait déjà est devenu net. Les tentatives de mouvements encore observées sont incapables de

(1) Identification due à l'obligeance du professeur Dalldorf à qui nous adressons nos remerciements.

soulever la ceinture pelvienne. Les pattes postérieures s'immobilisent indifféremment en flexion ou en extension. A la soixantième heure, le souriceau git, inerte, présentant souvent des signes de cyanose.

Les souriceaux inoculés par voie intracérébrale présentent toujours un retard de douze heures pour l'apparition des mêmes symptômes.

*Aspect histopathologique* : Si l'on tente de faire la synthèse de l'ensemble des constatations histopathologiques, on aboutit aux conclusions suivantes :

1° Les lésions histopathologiques vont sensiblement de pair avec les signes cliniques et, aussi bien pour les souriceaux inoculés par voie intracérébrale ou intrapéritonéale, on ne décèle aucune altération dans les prélèvements de la douzième et de la vingt-quatrième heure.

2° De même que sur le plan clinique, il s'avère exister un léger décalage dans l'apparition des lésions histopathologiques entre souriceaux inoculés par voie intracérébrale et souriceaux inoculés par voie intrapéritonéale : pour les premiers, les lésions apparaissent à la quarante-huitième heure, tandis que pour les seconds ces mêmes lésions seront trouvées à la trente-sixième heure.

3° Compte tenu de la remarque précédente, et si l'on désigne par « T » (2) l'époque d'apparition des premières lésions, on aboutit aux constatations suivantes :

Alors qu'au temps T — 12 h, aucun signe prémonitoire valable ne pouvait être retenu, au temps T vont apparaître assez brutalement :

a) Un énorme œdème interstitiel au niveau des muscles de la ceinture pelvienne et plus spécialement sur les muscles qui prennent leur insertion sur la face antérieure et antéro-externe du trochanter et sur la branche ilio-pubienne. A peu près simultanément, cet œdème apparaît dans les muscles de la loge antérieure de la cuisse et dans le psoas.

b) En même temps que cet œdème s'observent des lésions musculaires très sévères et qui consistent en une hypotrophie ou une atrophie des fibres striées des groupes musculaires plus haut cités ; certaines de ces fibres perdent leur striation et font une dégénérescence hyaline. Dans certaines fibres également on peut saisir des images de caryorrhexis. Il convient de noter que les lésions peuvent être plus accusées sur un hémibassin que sur l'autre.

c) Les lésions viscérales sont très discrètes, varient d'un sujet à l'autre et consistent en un infiltrat pulmonaire interstitiel lympho-histiocytaire plus ou moins important.

Au temps T+12, on va observer :

a) Au niveau des groupes musculaires déjà atteints au temps T, une diminution de l'œdème et l'apparition d'un infiltrat interstitiel important de nature essentiellement lympho-histiomonocytaire ;

b) Une aggravation des lésions musculaires, et on peut saisir dans certaines fibres altérées des tentatives de régénérescence (mise en état histiocytaire de la fibre) avec plurinucléation très marquée de cette dernière ;

(2) T se situe vers la trente-sixième heure pour la série inoculée par voie intrapéritonéale et vers la quarante-huitième heure pour la série inoculée par voie intracérébrale.

c) Simultanément, l'apparition des lésions d'autres groupes musculaires : ceux des muscles de la ceinture pelvienne qui n'étaient pas atteints, les muscles jambiers (atteinte discrète), les muscles de la ceinture scapulaire (l'atteinte de ces derniers pouvant être constatée seulement au temps T + 24 h).

d) Les signes viscéraux se résument toujours à une broncho-pneumonie interstitielle plus ou moins marquée.

*Au temps T + 24 h :*

a) Les atteintes musculaires vont porter, mais de manière inconsistante, sur de nouveaux groupes : intercostaux, muscles de la paroi abdominale, muscles des gouttières vertébrales, diaphragme (un cas seulement).

b) Au niveau des muscles premiers atteints, l'œdème a beaucoup diminué ; par contre, infiltrat et lésions dégénératives sont plus vifs.

c) Le myocarde présente de l'œdème interstitiel et on peut y saisir quelques rares coulées d'infiltrat lympho-histiocytaire.

d) Au niveau du poumon, on note des hémorragies alvéolaires contingentes, mais pouvant aller jusqu'à la constitution de véritables inondations hémorragiques pulmonaires.

*Le temps T + 36 h* n'est pas toujours atteint et les lésions histologiques sont assez superposables à celles du temps T + 24.

Ces faits sont d'ordre positif, par contre on peut noter comme caractères négatifs :

1° L'absence d'altérations des muscles linguaux, laryngés, carpo-métacarpiens et tarso-métatarsiens, encore que ces deux groupes musculaires puissent être très tardivement touchés.

2° L'absence d'altérations (au moins histologiquement décelables) du foie, des reins, du pancréas (endocrine et exocrine), de l'intestin, des gonades, de la thyroïde, du thymus, de la rate, des tissus osseux, cartilagineux, et enfin et surtout de l'axe encéphalo-médullaire.

L'affection en cause ici se présente avant tout comme une myopathie avec atteinte précoce des muscles de la ceinture pelvienne et des cuisses, se généralisant par la suite et s'accompagnant d'une fréquente atteinte pulmonaire.

CONCLUSIONS. — Chez les souriceaux de 48 h inoculés avec une souche de Cocksackie du groupe A, les examens anatomo-pathologiques sérieux à intervalles réguliers montrent que les muscles atteints sont le siège d'un œdème interstitiel d'apparition assez brutale qui ensuite diminue notablement alors qu'apparaissent une infiltration inflammatoire et des lésions dégénératives. Les lésions musculaires sont d'abord localisées aux muscles de la ceinture pelvienne puis progressent vers l'extrémité céphalique, intéressant tour à tour les muscles de la paroi abdominale, des gouttières vertébrales, des espaces intercostaux et atteignant enfin la ceinture scapulaire. Des lésions pulmonaires et parfois myocardiques surviennent ensuite, annonçant le stade terminal.

On ne peut manquer d'être frappé par la similitude que présentent tous les souriceaux dans la régularité de l'ordre d'apparition des atteintes musculaires.



## SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF COXSACKIE VIRUS.  
EVOLUTION OF THE LESIONS IN SUCKLING MICE.

Forty-eight hours old suckling mice are inoculated with a Coxsackie A virus strain. Serial histopathological studies, carried out at constant intervals, show in the diseased muscles an interstitial oedema, appearing rather suddenly and then significantly decreasing ; at the same time, an inflammatory infiltration and degenerative lesions appear. The lesions are first localized in the pelvic muscles ; they reach the abdominal, the vertebral, the intercostal spaces muscles, and at last, the scapular muscles.

Then pulmonar and sometimes myocardial lesions appear, preceding the death of the animal.

In all the suckling mice studied, the muscular lesions always appear following the same order.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRES (P.), CAMAIN (R.) et coll. *Bull. Méd. A. O. F.*, 1958, 3, 222.  
[2] JOHNSON (T.). *Meddel Stat. Bakt. Lab. Stockholm*, 1954-1955, 21, 5.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Propriétés biochimiques des germes coliformes hémolytiques isolés au cours du syndrome entéro-toxique colibacillaire du porcelet**, par CL. QUINCHON, M. HENRY et M<sup>me</sup> G. HENRY.

**Action sur les tissus de la souris de certains vaccins préparés avec des souches de *Salmonella* pathogènes et non pathogènes pour cet animal**, par M<sup>me</sup> J. GRABAR.

**Etude sur l'antigène soluble du virus rabique**, par J. M. VILLEMOT et A. PROVOST.

**Mammite staphylococcique de la brebis et vaccination locale**, par J. PILLET, O. GIRARD, H. DUTHEIL et B. ORTA.

**Réactions de fixation du complément chez les sujets atteints de grippe asiatique et rôle de l'âge dans l'élaboration des anticorps réagissant avec différents antigènes du groupe A**, par R. SOHIER, J. THIVOLLET, J. FREYDIER et F. CHALLUT-THAL.

**Dualité de la réaction cellulaire au cours de l'histoplasmose. Caractère histiocytaire de l'histoplasmose à petites formes et caractère géantocellulaire de l'histoplasmose à grandes formes**, par J.-C. LEVADITI, E. DROUHET, G. SEGRETAIN et F. MARIAT.

**Solubilisation de phosphates naturels par les germes du sol**, par A. ROCHE et H. DE BARJAC.



# JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Contents of Volume 20, No. 1, February 1959.

- KRISS, A.E. and MITZKEVICH, I. N. *Krassilnikoviae*: a new class of micro-organisms found in sea and ocean depths.
- MENNA, M.E. di. Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats.
- KOCKOVA-KRATOCHVÍLOVÁ, A. and SVOBODOVÁ-POLÁKOVÁ, Y. *Nadsonia slovaca* nov. sp.—isolated in Slovakia.
- CHRISTIAN, J. H. B. and INGRAM, M. The freezing points of bacterial cells in relation to Halophilism.
- CHRISTIAN, J. H. B. and INGRAM, M. Lysis of *Vibrio costicolus* by osmotic shock.
- EBERHART, B. M. and TATUM, E. L. A gene modifying the thiamine-requirement of strains of *Neurospora crassa*.
- OLITZKI, A. L. and GODINGER, D. Investigation on streptomycin inhibitors with the aid of a streptomycin-dependent *Vibrio comma*.
- CARTWRIGHT, S. F. and THORNE, H. V. Some applications of detergents to the study of the virus of foot-and-mouth disease.
- SHAH, P. C. and KING, H. K. Amino acid requirements for formation of ine reductive amination system in *Bacillus subtilis*.
- BISSET, K. A. Some characters of *Rhizobium* strains from tropical legumes.
- DOREY, M. J. Some properties of a pectolytic soil *Flavobacterium*.
- WILDY, P., STOKER, M. G. P. and ROSS, R. W. Release of herpes virus from solitary HeLa cells.
- CADMAN, C. H. Some properties of an inhibitor of virus infection from leaves of raspberry.
- GORDON, R. E. and MIHM, J. M. A comparison of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*.
- SPICER, C. C. and DATTA, N. Reversion of transduced antigenic characters in *Salmonella typhimurium*.
- CLARKE, P. H. and MEADOW, P. M. Evidence for the occurrence of permeases for tricarboxylic acid cycle intermediates in *Pseudomonas aeruginosa*.
- CLARKE, P. H., GLOVER, P. and MATHIAS, A. P. The occurrence of polyol derivatives of cytidine diphosphate in micro-organisms.
- WIAME, J. M., HARPIGNY, R. and DOTHEY, R. G. A new type of *Acetobacter*: *Acetobacter acidophilum* (provisional species).

*The subscription rate is 90s. net per volume of 3 parts,  
Single parts 35s. each, plus postage.  
Two volumes will be issued each year. Orders should be sent to*

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS  
BENTLEY HOUSE 200 EUSTON ROAD, LONDON. N.W. 1

Printed in France.

Le gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1959. — 1<sup>er</sup> trimestre. — Numéro d'ordre 3213. — Masson et Cie, édit., Paris.  
Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.